

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL GEN *lom* DEL
BACTERIÓFAGO λ Y SU PAPEL EN LA ADHESIÓN DE
Escherichia coli K12 A CÉLULAS BUCOEPITELIALES
HUMANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

OCTAVIO PATRICIO GARCÍA GONZÁLEZ



DIRECTOR DE TESIS: Dr. SERGIO VACA PACHECO

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO. Mayo 2005



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.

Agradecimientos

Hay tantas personas, momentos y sitios a quien agradecerles en todo este tiempo que forzosamente he de hacer alguna omisión por descuido. Algunas de las personas que me llegan a la mente en este momento son las siguientes:

- A Don Pablo y Doña Paula García, caballero y dama inseparables, ejemplo de amor. Aún no los dejo ir, no quiero hacerlo.
- A mi ma´. Por que me enseñó que además de ser una madre amorosa, solidaria, y defensora de sus hijos como de nadie, es en esencia una mujer admirable, sincera y llena de curiosidad por la vida. Gracias por la Fe Doña Paty.
- A mi pa´. Ejemplo de inteligencia, carácter y amor. Y por que a pesar de los desencuentros siempre entendió de que se trató este andar tras de la vida reinventándose. Gracias por que a pesar de los desencuentros siempre tuviste un reencuentro con “foforito”.
- A todos los gavilanes, César (mi compañero de niño), Gabo (por su inquietud por la familia), Pablo (que te puedo decir que no te haya dicho una tarde de Pink y una noche de Floyd, gracias compañero), Emy (por que me has permitido tener tu confianza), David (por tu optimismo desmedido que me enseñó a confiar en ti) e Isaac (Por ser tan fuerte y aún así permitirte amabilidad conmigo). Y a todos los gavilanes de nuevo por ser siempre siempre, desde Iztamatitlán, esencialmente Garcías.
- A las nuevas Gavilanas, Nancy y Mony, que decidieron ser amigas y familia (Welcome to the Jungle!). Y por supuesto, a las gavilancitas recién desempacadas, Polet e Ixchel, la cereza del pastel de la familia.
- A Gloria Luz Paniagua, por haberme brindado su confianza, apoyo incondicional y casa, pero sobre todo por su amistad incondicional.
- A Diego Arenas, por sus atinados comentarios en la elaboración de este escrito y por haber sido durante toda mi estancia en este laboratorio un ejemplo de amabilidad y curiosidad científica.
- Al M.en C. Eric Monroy por la revisión de éste manuscrito y por ser un excelente colaborador durante todo este tiempo.
- Al Dr. Erasmo Negrete. Gracias por la confianza y el apoyo Erasmo, realmente te considero uno de mis buenos amigos, y has sido un ejemplo de trabajo disciplinado. Ah! Y gracias por aguantar mis berrinches!
- A todos aquellos estudiantes de la carrera de biología con quienes tuve la suerte de coincidir como su asesor en el laboratorio de genética, ya que través de ustedes aprendí que ser maestro es la mas intensa de las responsabilidades y por darme su confianza y el beneficio de la duda. Gracias Leobardo, Nora, Luz, Alejandra, Ana, Lupita, Verónica, Yazmín, Diego, Verito, Paty, Clara, Elisa, Leticia, Andrea, Juan , Fernando, Wendy, Yarely, Liliana, Ángel, Wendy y otros que por descuido de mi parte no menciono.

- Capítulo aparte merecen mis amigos del lab. de genética, que si bien han sido mis alumnos durante los últimos 3 años, me han honrado con su amistad y han formado un equipo de trabajo lleno de disciplina, afecto, y solidaridad. Ellos son mi mejor recuerdo de mis días de profe en el Lab. de Genética. Gracias por absolutamente toda su generosidad Ricardo, Lolita, y Fabi: Me siento muy orgulloso de ustedes, en los momentos difíciles siempre conté con ustedes, espero algún día poder retribuirles al menos algo de lo mucho que me han dado.
- A mis amigos de la carrera, Karla Abbadié (gracias por tu impresionante dulzura), Berta (por que siempre fui su chapu), Fernando Fernández (Gracias por que a pesar de tu aplastante autismo siempre has sido mi gran amigo (a), ah! y por lo útil que me fue tu tríptico de tesis, jaja).
- Especialmente quiero agradecer a todos aquellos amigos profesores que me han demostrado su confianza y cariño. A Rodolfo Cárdenas, mi buen amigo, hombre inteligente, generoso y bohemio, a Nacho, ejemplo de honestidad, brillantez y trabajo, tú me diste la primera motivación para querer ser científico, a Sergio Cházaro, por que has sido un gran amigo, apoyo invaluable y muestra de sencillez, a Paty Dávila, quizá la mujer mas férrea y amable que he conocido en esta escuela, no dejo de admirarle y de agradecer su empuje y fe en mí. A Mony del Lab. de histología, por su amistad, agradable plática y las innumerables tazas de café que le gorreé. A carmelita de la jefatura de Biología, por su buen ánimo, ayuda incondicional y los mimos diarios.
- Les debo un agradecimiento remarcado a las maestras Ma. Eugenia Heres y Leonor Abundis, por que a fuerza de atravesarse en mi camino, se encargaron de reafirmarme por comparación quien soy y a donde quiero llegar, gracias!, prometo regresarles algún día todos los encuentros y sabias decisiones sobre mi persona con la misma fuerza y objetividad que tuvieron para conmigo.
- A la Dra. Gaby Olmedo del CINVESTAV U. Irapuato, por que confió en mí, y supo abrir mi campo de pensamiento a fuerza de análisis, buen trato y amistad, Gaby, hasta la fecha eres uno de mis modelos a seguir, ojalá algún día tenga esa fuerza inagotable que tanto te admiro.
- ¿Por qué dejo hasta el último este agradecimiento tan obvio? Quizá por eso, por que es obvio agradecerle a mi maestro, a mi amigo, a mi cómplice, a mi compañero de tantos años. A ti Sergio no puedo agradecerte nada aún, no tengo la capacidad para hacerlo, escriba lo que escriba me faltarían palabras. Quizá la mejor forma de agradecerte sea llegando la próxima vez al laboratorio, encontrarte y saludarte con un simple “que hubo Prof.”, me has enseñado tanto de ti y de mi, que no puedo aún agradecértelo. Confiaste desde el inicio en ese chavito “atípico” que llegó el primer día tarde a tu clase de genética, y continuaste confiando en mí, en ocasiones aún a pesar de mi mismo; ¿como puede uno agradecerle a alguien que ha estado ahí a pesar y a favor de todo, sin interés y con todo el interés del mundo?, por eso digo, no puedo agradecerte nada, aún no tengo la capacidad de hacerlo. Ya hemos sido compañeros de muchos años y cómplices de muchos más. Sabes bien lo que es para mi este trabajo que presento hoy, y no puedo hacer menos que dedicártelo. Ésta tesis va dedicada completamente a ti, amigo único, alma insomne, saltimbanqui...

All that you touch
All that you see
All that you taste
All that you **feel**
All that you **love**
All that you **hate**
All you **distrust**
All that you save
All that you give
All that you deal
All that you buy
beg, borrow or steal
All you create
All you **destroy**
All that you do
All that you say
All that you eat
everyone you meet
All that you slight
everyone you fight
All that is now
All that is gone
All that's to come
and everything under the sun is in tune
but the sun is eclipsed by the moon.

Roger Waters -Pink Floyd-
"Dark side of the moon"

Ocurre que la realidad es superior a los sueños.

En vez de pedir "déjame soñar", se debería decir: "déjame mirar".

Juega uno a vivir.

- Jaime Sabines -

-

Una piedra en el camino

me enseñó que mi destino

era rodar y rodar...

después me dijo un arriero

que no hay que llegar primero

pero hay que saber llegar...

-José Alfredo Jiménez-

Índice

Introducción

Historia del estudio de los bacteriófagos	7
Utilidad de los bacteriófagos para la biología molecular	8
Ciclo de vida de los bacteriófagos	9
Equilibrio presa-predador.....	12
Transducción.....	14
Conversión lisogénica.....	15
Bacteriófago λ	16
Genes accesorios de λ	20
El gen <i>lom</i>	21
Familia de genes OMP.....	22
Adhesión bacteriana.....	24
Transferencia genética y evolución molecular.....	26

Objetivos	28
------------------------	----

Material y métodos

Bacterias y bacteriófagos.....	29
Reactivos, soluciones y medios de cultivo	31
Obtención de lisados fágicos	35
Titulación de lisados	35
Ensayo de adhesión	35
Ensayo de invasión	36
Extracción de DNA de bacteriófagos.....	39
Extracción rápida de DNA plasmídico	40
Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala	41
Extracción de DNA genómico de bacterias	42
Preparación de células competentes y transformación de DNA plasmídico.....	42
Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	43
PCR y clonación del gen <i>lom</i>	44
Exploración por PCR de secuencias homólogas a <i>lom</i>	47

Resultados

El gen <i>lom</i> del bacteriófago λ incrementa la adhesión de <i>E. coli</i> K12 a CBH	48
El gen <i>lom</i> favorece la invasión de <i>E. coli</i> K12 a CBH	52
Evolución molecular del gen <i>lom</i>	52
Secuencias regulatorias del gen <i>lom</i> del bacteriófago λ	63
Regiones conservadas de la proteína Lom	65

Discusión

El papel del gen <i>lom</i> en la adhesión de <i>E.coli</i> K12 a CBH	65
Mecanismo de adhesión de la proteína Lom	68
Internalización bacteriana mediada por Lom	69
Evolución molecular del gen <i>lom</i> vs. patogénesis.....	71
Regulación de la expresión de <i>lom</i>	73
Acerca de la naturaleza molecular de <i>lom</i>	74
El gen <i>cig</i>	77
Bibliografía	78

Introducción:

Historia del estudio de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, o fagos, son virus parásitos intracelulares obligados que infectan a bacterias. Su parasitismo es en el ámbito genético ya que para multiplicarse intracelularmente requieren de la maquinaria biosintética bacteriana (replicación, transcripción, traducción).

Los bacteriófagos fueron descubiertos independientemente por F.W. Twort en 1915 y por F. D'Herelle en 1917 siendo este último quien les asignó el nombre de bacteriófagos (devoradores de bacterias) y diseñó el método de titulación, en uso actualmente, que permite contar el número de unidades formadoras de placa (ufp) presentes en una suspensión; es decir, el número de fagos capaces de infectar productivamente a bacterias sensibles causando la aparición de una placa de lisis sobre un cultivo bacteriano que ha sido inmovilizado en agar. Generalmente el número de ufp es menor que el número de partículas fágicas en la suspensión, debido a que una fracción de estas últimas es incapaz de infectar productivamente como resultado de algún defecto estructural (e. g. ruptura de la cápside o de la cola).

En la década de los 30's Schlesinger contribuyó importantemente al estudio de los bacteriófagos: purificó una cantidad ponderable de fagos por centrifugación diferencial y filtración gradual de preparaciones crudas de fagos, y realizó el análisis químico, encontrando que estaban constituidos por 50% de proteína y 50% de DNA. El bacteriófago estudiado por D'Herelle y Schlesinger era uno de los fagos T pares de *E. coli* (T2 ó T4).

En 1938 el notable físico Max Delbrück formó “la escuela del fago”, que por más de 10 años dedicó sus esfuerzos al estudio de los fagos T pares, en particular T2 y T4. Este

grupo de investigadores hizo varias contribuciones importantes para el conocimiento de los fagos, entre las que destacan el experimento de crecimiento en escalón y el ensayo sobre el crecimiento intracelular del fago. En el primero se determinó con precisión el número promedio de fagos producido por cada bacteria infectada (tasa de eclosión, según la atinada traducción del término “burst size” que hiciera el Dr. Romilio Espejo) y el tiempo mínimo necesario que debe transcurrir desde el inicio de la infección hasta que se lisan las primeras bacterias del cultivo, liberando la progenie viral (periodo de latencia). El segundo de los experimentos mencionados permitió establecer que durante parte del periodo de latencia el virus infectante no está completo y su auto-replicación no es binaria, sino que los virus descendientes se ensamblan a partir de subestructuras sintetizadas previamente; el ensamble de las partículas virales ocurre después de un lapso característico, denominado periodo de eclipse, menor que el periodo de latencia (Ellis y Delbrück, 1939).

Utilidad de los fagos para la Biología Molecular

Los trabajos del grupo de Delbrück resultaron ser la mas importante aportación para el nacimiento de lo que ahora se conoce como Biología Molecular, y desde el inicio de esta disciplina los bacteriófagos han jugado un papel preponderante en su desarrollo. Recuérdese, por ejemplo, que una de las demostraciones más sólidas de que el DNA es el material genético la constituyó el experimento de Hershey y Chase en 1952 con el fago T2. Más adelante los fagos se han utilizado ampliamente como modelo de estudio de distintos problemas de biología molecular, e. g. los fagos cuyo genoma es RNA pequeño de cadena sencilla se usaron como RNA mensajero para el estudio de la traducción *in vitro* en sistemas libres de células. Los fagos con genoma de DNA de cadena sencilla fueron un modelo excelente para estudiar la replicación del DNA, ya que mediante el estudio de la

replicación *in vitro* fue posible caracterizar muchos componentes que participan en el proceso y estudiar los intermediarios replicativos, que pudieron “congelarse” al omitir el (los) componente (s) necesario (s) para el siguiente paso. El estudio de los fagos de DNA de doble cadena con mayor contenido de DNA permitió elucidar un gran número de mecanismos de control de la expresión genética (represión, antiterminación de la transcripción, expresión genética secuencial, retrorregulación, etc.).

Ciclos de vida de los fagos.

La infección comienza por la colisión al azar entre fagos y bacterias que conduce a la adsorción del fago a un receptor específico situado en la superficie bacteriana (alguna porción del lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas o alguna proteína de la membrana externa) mediante una reacción de primer orden (Luria *et al.*, 1978). Algunos fagos, como f1 y f2 se adsorben específicamente al pilus F de *E. coli* y por esta razón sólo infectan a las cepas macho, portadoras del plásmido F. El fago χ de *Salmonella* se adsorbe al flagelo bacteriano (Luria *et al.*, 1978). Después de adsorberse el bacteriófago inyecta su DNA, mediante un proceso complejo que, en T4, se inicia con la contracción de la vaina contráctil de la cola viral (Arscott y Goldberg, 1976; Moody, 1973) que rodea al tubo central de ésta, el cual es introducido al interior de la bacteria y a través suyo pasa el DNA, de modo lineal, desde un extremo al otro. El DNA viral inyectado se replica y en la etapa final de su desarrollo dirige la síntesis de las proteínas estructurales de cabeza y cola y de las copias de DNA que habrán de encapsidarse para formar los nuevos viriones, los cuales serán liberados cuando se lise la bacteria por la acción de proteínas de lisis codificadas también por el genoma viral (Figura 1).

En la vía lisogénica, la infección ocurre análogamente a como sucede en la vía lítica en lo que se refiere a la adsorción e inyección. Sin embargo, la expresión de los genes estructurales y de lisis es reprimida merced a la acción de una proteína represora, codificada por el genoma viral, la cual se une a sitios específicos (operadores) del cromosoma fágico impidiendo el acceso de la RNA polimerasa a los promotores. El genoma viral reprimido se llama *profago*, la bacteria que lo porta se denomina *lisógena* y el proceso que conduce a la formación de ésta se designa como *lisogenización*. Algunos profagos se integran al cromosoma bacteriano en un sitio específico (e. g. λ) y se replican pasivamente como parte de éste heredándose a las células hijas, en tanto que otros permanecen como plásmidos y se replican en forma autónoma (e. g. el fago P1 de *E. coli*). (Figura 1).

Una lisógena puede ser destruida y dar origen a progenie fágica cuando ocurre el proceso de inducción, en el cual el profago es conducido al crecimiento lítico por agentes físicos (e.g. irradiación con luz U.V.) o químicos (e. g. mitomicina C) que dañan al DNA o interfieren con su replicación. La inducción del profago forma parte de una compleja serie de respuestas, conocida como sistema SOS, que presentan las bacterias ante situaciones que comprometen su sobrevivencia y en la cual una actividad proteolítica inducible (RecA) degrada al represor del genoma viral (Little y Mount, 1982).

En un cultivo de lisógenas la desrepresión ocurre espontáneamente a baja frecuencia (10^{-6}), ocasionando que haya fagos libres. Es posible también que ocurra desrepresión transitoria; es decir, que falle la represión por un breve lapso y se restablezca enseguida, dando lugar a bacterias “curadas” que han perdido el profago, ya que, si éste se encontraba integrado al cromosoma, se escinde pero es incapaz de iniciar la vía lítica al restablecerse la

represión, de modo que ya no se replica como parte del cromosoma bacteriano ni en forma autónoma y se pierde por dilución a medida que el cultivo crece.

En una bacteria lisógena el profago se mantiene como tal debido a que codifica al represor, del cual siempre hay un exceso en el citoplasma bacteriano. Por esta razón, la lisógena es inmune a la superinfección por fagos homólogos al profago: si un fago homólogo al profago (de la misma inmunidad, con los mismos operadores) inyecta su ácido nucleico, éste es reprimido por el represor citoplásmico y no puede seguir ni la vía lítica ni la lisogénica. Así pues, la lisogenia se caracteriza por 4 propiedades: 1) Heredabilidad, 2) Inducibilidad, 3) Inmunidad y 4) Curabilidad

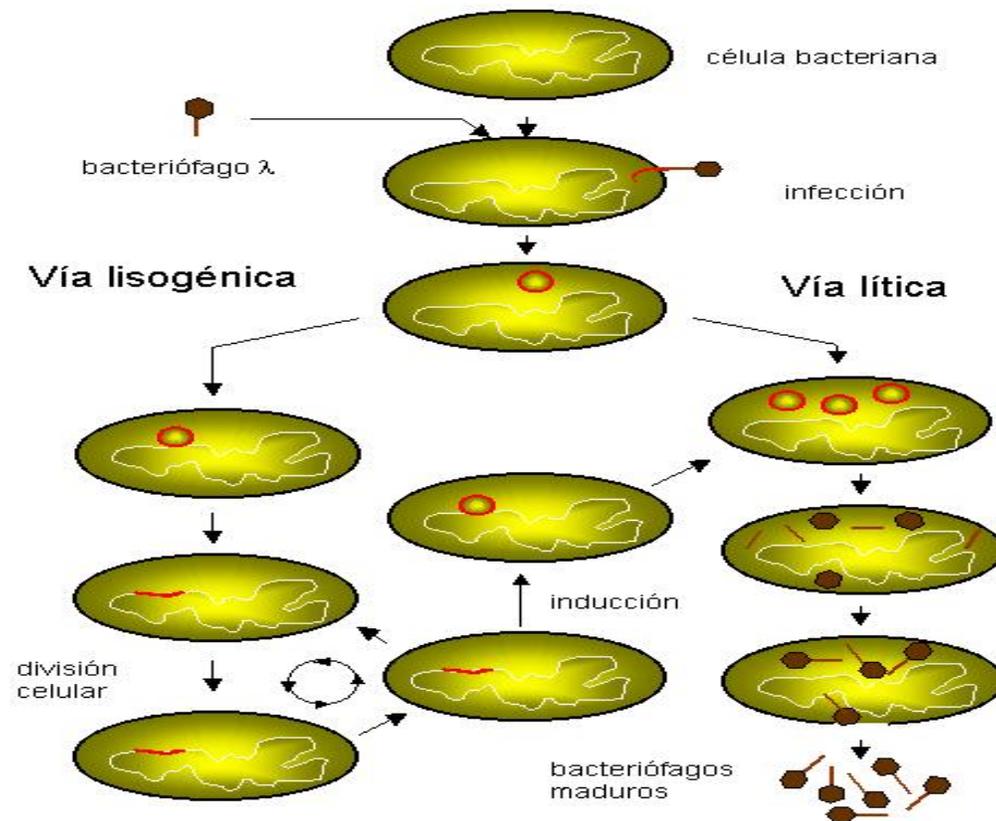


Fig.1 Ciclo de vida del bacteriófago λ . Después de la infección del fago λ , éste se desarrolla siguiendo la vía lítica o la lisogénica.

Equilibrio presa-predador

Además de su indudable importancia como sistemas modelo para el estudio de problemas de biología molecular, los bacteriófagos son interesantes por sí mismos desde el punto de vista ecológico, ya que establecen complejas relaciones presa-predador con las bacterias.

Debido a que los bacteriófagos se multiplican en las bacterias y al hacerlo las lisan, se podría pensar que en algún momento podrían acabar con ellas, condenándose a desaparecer. Sin embargo, fagos y bacterias establecen varios equilibrios presa-predador (Echols, 1979): simple, mutacional y lisogénico, que contribuyen, por separado o en conjunto a mantener el delicado balance entre presa y predador.

Equilibrio simple.

En el equilibrio simple, la adsorción de los fagos a las bacterias se ajusta a una cinética de primer orden y está limitada por la tasa de crecimiento bacteriano, es decir, al inicio de la infección del cultivo, cuando la proporción fago/bacteria es baja, una importante fracción de la población bacteriana no es infectada, y las bacterias de una pequeña fracción serán infectadas por un solo fago cada una. Las fracciones de bacterias no infectadas, infectadas por un fago, por dos, por tres, etc. pueden calcularse mediante la distribución de Poisson, si se conoce la multiplicidad de infección, es decir, la proporción fago/bacteria en la mezcla de infección. Mientras el fago se multiplica intracelularmente, las bacterias no infectadas se dividen, los fagos que se liberan a la lisis infectan a otra fracción de la población bacteriana, pero aún queda otra fracción de bacterias no infectadas que se multiplica, de las cuales una fracción será infectada, y así sucesivamente.

Equilibrio mutacional.

Cuando una población de bacterias está expuesta a la infección por una población de fagos, éstos constituyen una presión selectiva a favor de las raras mutantes bacterianas, presentes en la población y surgidas al azar, que no permiten la infección fágica debido a que carecen del receptor específico utilizado por el fago para adsorberse a la superficie bacteriana. Este tipo de mutantes carentes de receptor, o con receptor alterado, son las más comunes entre las mutantes resistentes a la infección. Existen otras que no impiden la adsorción sino que poseen nucleasas que degradan al DNA viral una vez que ha sido inyectado, o que interfieren con la expresión de genes esenciales del fago. Las bacterias mutantes resistentes se multiplican y constituyen ahora una presión de selección a favor de los fagos mutantes, también poco frecuentes, capaces de adsorberse a otro receptor o al receptor alterado. Estos mutantes fágicos se multiplicarán hasta que se seleccionen otras bacterias mutantes resistentes, que serán muertas por otros fagos mutantes y así sucesivamente.

Equilibrio lisogénico.

Como se describió anteriormente, en la lisogenia fago y bacteria coexisten en armonía merced a la represión de las funciones líticas del fago. La resistencia y el equilibrio simple son formas de equilibrio comunes a todos los fagos, en tanto que la lisogenia está limitada solamente a los fagos temperados, capaces de lisogenizar.

Fagos benéficos para la bacteria.

Los bacteriófagos pueden ser benéficos para la bacteria que infectan mediante los procesos de transducción (especializada o generalizada) y de conversión lisogénica, cuyo resultado es la adquisición de nuevas características fenotípicas por la bacteria, que podrían serle benéficas o indispensables en determinados nichos ecológicos.

Transducción.

La transducción es un mecanismo de transferencia de información genética en bacterias mediado por fagos. La mayoría de los fagos transductores conocidos son temperados. Entre los más estudiados se encuentran P22 de *Salmonella typhimurium*, P1 de *Escherichia coli*, F116L de *Pseudomonas aeruginosa*.

La transducción es de dos tipos: generalizada (o por reemplazo) y especializada (o por adición). En la primera, el fago transductor es capaz de transducir cualquier marcador genético del cromosoma de la cepa donadora a la receptora, mientras que en la segunda sólo se transducen el o los marcadores cercanos al sitio de integración del profago transductor. P1, P22 y F116L son transductores generalizados y el fago λ de *E. coli* es el transductor especializado que se conoce más detalladamente (transduce sólo el operón *bio* o el operón *gal*, los cuales flanquean al profago integrado).

En la transducción especializada, el profago se escinde en forma aberrante, perdiendo algunos genes no esenciales para su multiplicación e incorporando segmentos adyacentes de DNA bacteriano. Cuando el bacteriófago infecta a otra bacteria, al integrarse le *adiciona* esos segmentos.

En la transducción generalizada algunos fagos, producidos a baja frecuencia (aprox. 10^{-7}) durante la infección de la cepa donadora, incorporan al azar en su cápside segmentos de DNA bacteriano cuyo tamaño es similar al del propio genoma viral. Al infectar posteriormente a la cepa receptora, el fago solamente sirve como vehículo para introducir el DNA de la donadora, el cual se aparea con la región homóloga del cromosoma bacteriano, *reemplazando* ese segmento por recombinación; no se produce progenie viral toda vez que el fago transductor no posee DNA propio.

Conversión lisogénica.

La conversión lisogénica se define como la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediada por un profago (Barksdale y Arden, 1974). Existen numerosos ejemplos de toxinas bacterianas codificadas por bacteriófagos (Bishai y Murphy, 1988); entre éstas se encuentran: la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae* (Freeman, 1951; Holmes y Barksdale, 1969), las toxinas eritrogénicas de *Streptococcus pyogenes* (Nida y Ferretti, 1982); la estafilocinasa y la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (Coleman, *et al.*, 1989), la toxina Shiga-like y la enterohemolisina Ehly2 producidas por *E. coli* (Newland *et al.*, 1985; Beutin *et al.*, 1993), la neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* (Barksdale y Arden, 1974) y la citotoxina codificada por el fago ϕ CTX de *Pseudomonas aeruginosa* (Hayashi *et al.*, 1993). Además de los genes que codifican para toxinas, se han descrito otros genes de virulencia en bacteriófagos, entre los que se encuentran el gen *oac*, que codifica para una acetilasa del antígeno O de *Shigella flexneri* (Clark *et al.*, 1991), genes para producción de cápsula en *Streptococcus pneumoniae* (Russel, 1991) y el gen *bor* del bacteriófago λ , que le confiere a *E. coli* resistencia al efecto bactericida del suero (Barondess y Beckwith, 1990). Es importante hacer notar que no existen reportes de bacteriófagos que incrementen la adhesión bacteriana a epitelios, excepto por un estudio preliminar en el que se describió el incremento en la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas (CBH) mediado por el profago FIZ15 (Vaca *et al.*, 1989).

Se ha sugerido que la persistencia de estos genes en los genomas virales les confiere ventaja evolutiva a los bacteriófagos, quizá debido a la mayor replicación de las bacterias que poseen estos determinantes de virulencia (Cheetham y Katz, 1995).

Bacteriófago λ

El fago λ de *Escherichia coli* está compuesto por aproximadamente 50% de proteínas y 50% de DNA de doble cadena. El tamaño de su genoma es de 48 502 pb, que corresponden a una masa de 32×10^6 Da. La molécula de DNA está contenida en una cápside icosaédrica de 0.055μ de diámetro que se encuentra unida a una cola tubular de 0.15μ de longitud. El DNA de λ posee extremos cohesivos de cadena sencilla (12 b) en ambos extremos 5' que le permiten circularizarse después de la inyección a la célula (Hershey, *et al.*, 1963; Young y Sinsheimer, 1964). El genoma de λ expresa aproximadamente 50 proteínas (Szybalski y Szybalski, 1979). Los genes de λ están agrupados como unidades funcionales, cuya localización en el genoma refleja su orden de expresión temporal.

El bacteriófago temperado λ puede seguir cualquiera de dos vías mutuamente excluyentes: el ciclo lítico o el ciclo lisogénico (Echols, H., 1972). Para el ciclo lítico se requiere la expresión de los genes *O* y *P* (para el inicio de la replicación del DNA viral) y de los genes *A-J* (alrededor de 20 genes para cabeza y cola) y de los genes de lisis *S* y *R* (lisis de la membrana y de la pared celular, respectivamente). Para el ciclo de vida lisogénico se necesita la expresión de los genes *int* (cuyo producto promueve la integración del cromosoma viral al bacteriano) y *cI* (el cual codifica al represor, que reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis).

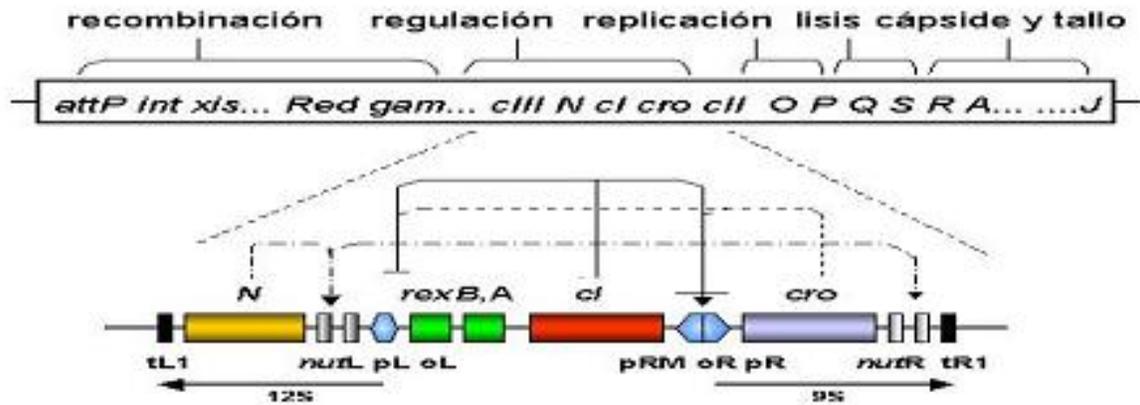


Fig.2 Mapa genético del fago λ (integrado), con agrupación de sus unidades funcionales (no a escala). A la derecha del sitio de integración *attP* se presentan los genes cuyos productos están involucrados en la recombinación. Posteriormente, la región de la regulación, la cual contiene los genes *cIII*, *N*, *ci*, *cro* y *cII*. Posteriormente están los genes cuyos productos están relacionados a la replicación, lisis y la formación de la cápside y tallo. En la parte inferior se muestra una ampliación de la región de la regulación. La represión por el represor *CI*, evita la transcripción a partir de los promotores *pR* y *pL*. La autoregulación activa o reprime al promotor *pRM*. Las flechas representan los ARNm terminados (en ausencia de *N*). 12S a partir del promotor *pL*, y 9S a partir del promotor *pR*.

La infección comienza por la adsorción de la partícula viral -vía la proteína J de la fibra de la cola a su receptor específico, la proteína lamB, implicada en el transporte de maltosa.

Después de la inyección, el DNA de λ se circulariza, por apareamiento de los extremos cohesivos, y es transcrito por la RNA polimerasa bacteriana a partir de dos promotores, P_R y P_L . La transcripción a partir de P_L se extiende hasta el terminador t_{L1} originando un transcrito de unos 1000 nucleótidos (Roberts, 1969), cuya traducción produce la proteína N (12.2 kDa) (Franklin y Bennet, 1979). El transcrito iniciado en P_R termina en t_{R1} y su traducción da origen a la proteína Cro (Roberts, 1969). En presencia de la proteína N la RNA polimerasa es capaz de trascender las señales de terminación (t_{L1} , t_{R1}

y t_{R2}) y la transcripción iniciada en P_L se extiende hasta la región *cIII-b*, en tanto que la transcripción de P_R se extiende hasta la región *cII-O-P-Q* (Gottesman *et al.*, 1980)

La antiterminación mediada por la proteína N requiere la presencia de sitios *nut* en el genoma viral (N utilization: *nutL*, situado entre P_L y *N*; y *nutR*, localizado entre *cro* y t_{R1}) (Salstrom y Szybalski, 1978; Rosenberg. *et al.*, 1978), y varias proteínas bacterianas, denominadas *nus* (N utilization substances) (Friedman y Baron, 1974; Friedman *et al.*, 1976, 1981).

Hasta este punto, las células infectadas contienen proteínas necesarias tanto para el crecimiento lisogénico (*cII* y *cIII*, que se requieren para la transcripción de *cI* e *int*) como para el crecimiento lítico (*O* y *P*, que participan en la replicación del DNA viral), y *Q* que estimula la transcripción de los genes tardíos (estructurales y de lisis). La decisión lisis-lisogenia depende de una compleja interacción (influenciada por las condiciones del medio) entre proteínas virales y bacterianas (Herskowitz y Hagen, 1980).

Para que λ lisogenice a *E. coli* se requiere que *cI* reprima la expresión de los genes estructurales y de lisis (Figura 4) y que el DNA viral se integre al cromosoma bacteriano (Figura 5). La integración ocurre por recombinación sitio específica, mediada por la proteína viral *Int* y el factor de integración del huésped (IHF), codificado por los genes bacterianos *himA* y *himD* (Miller y Nash, 1981).

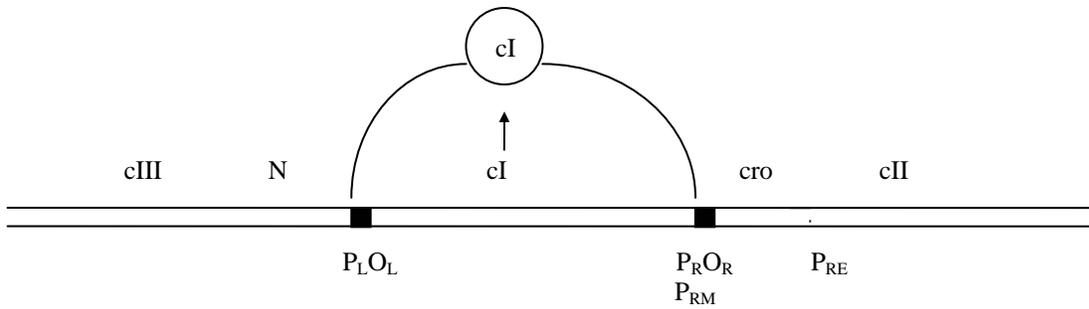


Figura 4. Para el establecimiento de la represión el gen *cI*, que codifica para el represor de λ , se transcribe a partir del promotor P_{RE} . El represor se une a los operadores O_L y O_R impidiendo la transcripción de los genes estructurales y de lisis. En el estado de profago la proteína *cI* regula su propia síntesis a partir del promotor P_{RM} (Echols y Green, 1971).

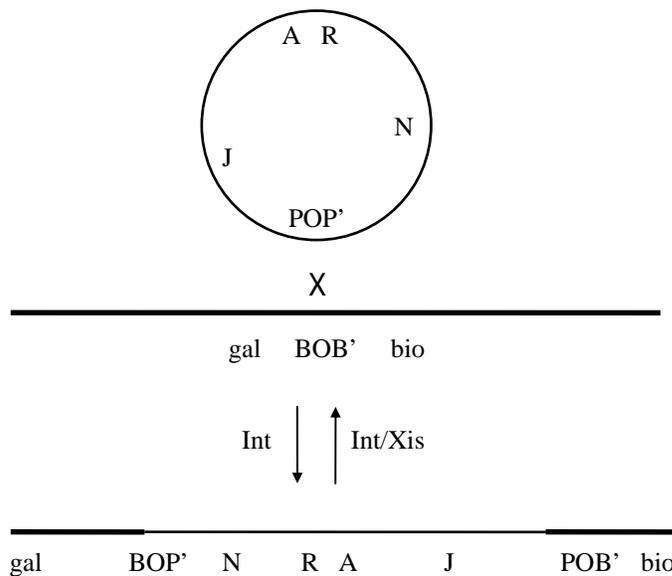


Figura 5. Integración y escisión del DNA de λ . La integración del genoma viral al bacteriano ocurre entre los operones *gal* y *bio* mediante recombinación entre los sitios *att* del fago (POP') y del cromosoma bacteriano (BOB'). La recombinación entre los sitios BOB' y POB' permite la escisión del DNA de λ si el profago es inducido al crecimiento lítico. La integración está mediada por la proteína viral *Int*, en tanto que la escisión requiere *Int* y *Xis*. En ambas reacciones participa el factor de integración del huésped (IHF), codificado por dos genes bacterianos. (Tomado de Echols y Guarneros, 1983).

Genes accesorios de λ

Los genes de λ que no se requieren para lisis ni para lisogenia se denominan accesorios. Estos genes se encuentran distribuidos en varias partes del genoma. El segmento mayor de DNA dispensable corresponde a 33% del genoma, entre el gen *J* y el gen *N* (ver figuras 2 y 3). Este segmento incluye a los genes de la región *b*, a la izquierda de *att*, y los genes del operón P_L a la derecha de *att*. El gen *rex* (situado inmediatamente a la izquierda de *cI*) tampoco se requiere para la formación de placas líticas. Otra región dispensable del genoma de λ se encuentra situada a la derecha de los genes *O* y *P*; la deleción de un segmento de 2.8 kb (deleción *nin5*) en esta región no tiene efecto alguno sobre el desarrollo del fago. Por último, hasta hace poco no se habían localizado genes en las últimas 2 kb del extremo derecho del genoma de λ (a la derecha del gen *R*) (Hernández *et al.*, 1985), sin embargo en 1990 se describió al gen *bor*, localizado a la derecha de *R* (Barondess y Beckwith, 1990).

Para los propósitos de este trabajo nos concentraremos en los genes de la región *b*, y particularmente en el de expresión tardía *lom*.

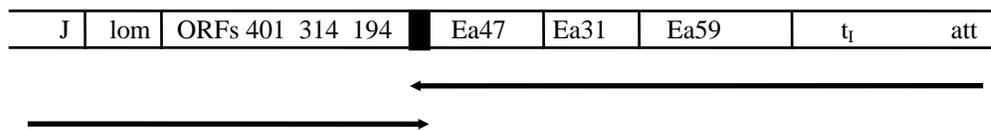


Figura 6. La región *b* de λ se localiza entre el gen *J* y el sitio *att*. Los transcritos temprano y tardío están indicados por la flecha que apunta a la izquierda y la que apunta a la derecha, respectivamente. El cuadro negro corresponde a la región intercistrónica entre los operones temprano y tardío. La transcripción temprana inicia en P_L y la tardía en P_R (ver figura 3). La secuencia de esta región indica la presencia de 3 marcos de lectura abierta (ORFs) a la derecha de *lom*. (Tomado de Court y Oppenheim, 1983).

Se ha especulado que la expresión de los genes tardíos de la región *b* procede del promotor P_R por extensión del transcrito de los genes estructurales tardíos (A-J) (Hendrix,

1971), ya que la transcripción de $P_{R'}$ es antiterminada por la proteína Q (Grayhack y Roberts, 1982). Sin embargo, mediante análisis *in vitro* se han detectado varios promotores en la propia región *b* (Kravchenko *et al.*, 1979; Lu y Mark, 1980; Vollenweider y Szybalski, 1978; Rosenvold *et al.*, 1980), de modo que hasta la fecha no ha quedado claro si los genes tardíos de la región *b* se expresan a partir de $P_{R'}$, de los propios promotores de *b* o de ambos. Tampoco se ha asignado función alguna para estos genes ni se conoce la regulación de su expresión. Otro aspecto controvertido acerca de los genes de la región *b* se refiere a si éstos se expresan en la lisógena, ya que se ha reportado que su transcripción es reprimida por el factor de integración del huésped (HIF) (Kur *et al.*, 1989) y también que la fusión *lom::TnphoA* (ver más adelante) se expresa en el profago (Barondess y Beckwith, 1990).

El gen *lom*

El gen *lom* fue descrito en 1979, codifica para una proteína de 20.5 kDa que se localiza en la membrana externa de *E. coli* (Reeve y Shaw, 1979). Se han generado fusiones *lom::TnphoA* por mutagénesis insercional con el transposón *TnphoA* (Barondess y Beckwith, 1990). Este transposón es un derivado del Tn5 (que confiere resistencia a kanamicina) que contiene el gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, sin su secuencia señal, insertado en el IS50 izquierdo (Manoil y Beckwith, 1985). Debido a que la fosfatasa alcalina es una enzima extracelular que solo puede ser exportada si posee una secuencia señal, la inserción de *TnphoA* en un gen cuyo producto sea una proteína de exportación genera una proteína fusionada con actividad de fosfatasa alcalina. Después de mutagenizar con *TnphoA*, las mutantes que posean fusiones se detectan como colonias azules al sembrar los candidatos en un medio de cultivo que contenga kanamicina y el substrato cromogénico

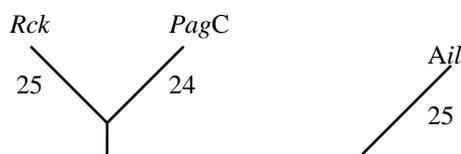
XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato), el cual es hidrolizado por la fosfatasa alcalina produciendo color azul. Las fusiones *lom::Tnp_{ho}A* se expresan en las lisógenas y las proteínas fusionadas se encuentran en la membrana externa (Barondess y Beckwith, 1990). Debido a que en una lisógena el promotor viral P_R' no es activo (por la ausencia de la proteína Q, que no se sintetiza debido a la carencia de la proteína N cuya expresión a partir de P_L está reprimida por la proteína cI), este resultado sugiere que *lom* se expresa en la lisógena a partir de algún promotor localizado en la región *b* y no a partir de P_R'.

La familia de genes OMP.

El gen *lom* forma parte de una familia de cinco genes que codifican para proteínas de membrana externa. Esta familia incluye a los genes *rck* y *pagC* (Heffernan *et al.*, 1992; Pulkkinen y Miller, 1991) de *Salmonella typhimurium*, al gen *ail* de *Yersinia enterocolitica* (Miller *et al.*, 1990) y al gen *ompX* de *Enterobacter cloacae* (Stoorvogel *et al.*, 1991). Los genes *rck*, *pagC* y *ail* confieren propiedades de virulencia (Tabla 1) y se ha propuesto que el ancestro de la familia es *lom* (Figura 7).

Tabla 1. Familia de genes *OMP*

Gen	Bacteria	Localización	Fenotipo	Referencia
<i>rck</i>	<i>S. typhimurium</i>	Plásmido	Resistencia al suero	Hackett <i>et al.</i> , 1987, Heffernan <i>et al.</i> , 1992.
<i>pagC</i>	<i>S. typhimurium</i>	Cromosoma	Virulencia en ratón	Miller, <i>et al.</i> , 1989.
<i>ail</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	Cromosoma	Adhesión e invasión	Miller, <i>et al.</i> , 1988, 1990.
<i>ompX</i>	<i>E. cloacae</i>	Cromosoma	?	Stoorvogel <i>et al.</i> , 1991.
<i>lom</i>	<i>E. coli</i>	Fago λ	Adhesión	Vaca <i>et al.</i> , 1997.



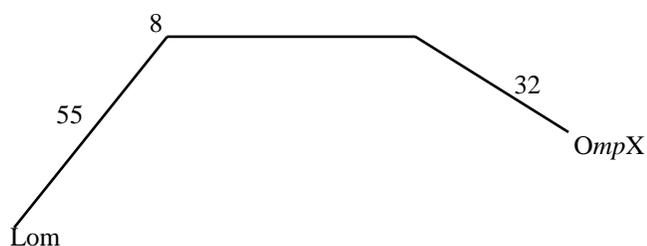


Figura 7. Árbol filogenético propuesto para los cinco miembros de la familia OMP. Basado en el análisis de las secuencias por computadora. Los números representan las distancias calculadas entre las secuencias de las proteínas. (Tomado de Heffernan *et al.*, 1992).

Debido a que uno de los miembros de esta familia génica participa en la adhesión (*ail*), dos fuertes grupos de investigación han indagado el posible papel de estos genes en la adhesión de *E. coli* a células eucarióticas cultivadas. El enfoque que utilizaron estos investigadores fue medir la adhesión de cepas de *E. coli* portadoras de un plásmido con cada uno de los genes de la familia OMP clonado; las células que emplearon fueron: CHO (ovario de hámster chino), HepG-2 (hepatocitos humanos) y Hep-2 (epitelio de laringe humana). Ambos grupos reportaron que el gen *ail* incrementa la adhesión y, en menor grado, también el gen *rck*. El gen *lom* no tuvo efecto sobre la adhesión de *E. coli* (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de los genes de la familia OMP sobre la adhesión de *E. coli*.

<i>E. coli</i> HB101 PORTADORA DEL PLÁSMIDO	ADHESIÓN A CÉLULAS		
	¹ CHO	¹ HepG-2	² Hep-2
PBR322 <i>rck</i>	+	+	
PBR322 <i>ail</i>	+	+	
PBR322 <i>lom</i>	-	-	
PBR322 <i>pagC</i>	-	-	
PBR322 <i>ompX</i>	-	-	
PUC18 <i>ail</i>			+
PUC18 <i>rck</i>			+
PBR322 <i>lom</i>			-

Modificado de: ¹Heffernan *et al.*, (1994) y ²Bliska y Falkow, (1992).

En nuestro laboratorio se realizó un estudio sobre la adhesión de *E. coli* K12 a CBH mediada por el bacteriófago lambda, y se encontró que *E. coli* lisógena para λ sí incrementa

su adhesión a CBH (Vaca, 1997), contrariamente a lo anteriormente mencionado por Heffernan *et al.*, (1994) y Bliska y Falkow, (1992).

Adhesión e invasión bacteriana.

La adhesión es la unión de las bacterias a una superficie, esta unión puede ser de carácter reversible o no. La adhesión a epitelios es una importante propiedad de virulencia de las bacterias, ya que es el prerrequisito para colonizar al hospedero e invadirlo, causando una infección localizada o sistémica. La adhesión ocurre por la asociación entre moléculas específicas de la superficie bacteriana (adhesinas) y receptores presentes en las células del hospedero (Beachey, 1981; Harp, 1988). Las principales adhesinas de las bacterias Gram negativas son estructuras proteicas superficiales con morfología de fimbria (también llamadas pili), fibrila o helicoidal. Entre las fimbriae destacan los pili tipo IV, por su importancia como factores de virulencia, que permiten la adhesión a células epiteliales de bacterias patógenas de los géneros *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Vibrio* y *Escherichia* (Strom y Lory, 1993, Gaastra y Svennerholm, 1996). Los receptores de las membranas celulares eucariontes a los que se unen las fimbriae son compuestos glicoconjugados que poseen una gran diversidad en las secuencias de oligosacáridos. Estos oligosacáridos no están distribuidos uniformemente entre especies, tejidos y células, lo que determina la preferencia de las bacterias patógenas por tejidos específicos de ciertos hospederos (tropismo) (Gaastra y Svennerholm, 1996); sin embargo, la adhesión de las bacterias a los epitelios es un fenómeno complejo que no solo está determinado por la presencia de fimbriae, sino que además, participan otros componentes bacterianos, como por ejemplo las proteínas asociadas a opacidad (Opa) (Pujol, C. et al 2000). Las proteínas Opa son moléculas de membrana externa descritas principalmente para *Gonococcus*, *Meningococcus* (Hauck, C. 2003), *Streptococci spp.* (Katerov, V. 2000) y *Staphylococci*

spp. (Foster, T. 1998). Su función en la bacteria está ligada a un amplio espectro de procesos patogénicos que van desde la adhesión e invasión a epitelios, transducción de señales, hasta el reconocimiento específico de nuevos huéspedes. Se considera a las proteínas Opa como el paradigma emergente que permite a ciertos tipos bacterianos reconocer nuevas líneas celulares, debido a la gran variabilidad traduccional que presentan proporcionándoles afinidad por nuevos receptores. Tómese en cuenta que la modulación de lipooligosacárido y pili esta pensado inicialmente para evadir la respuesta inmune del organismo y generar la asociación primaria con las células eucariontes, permitiéndole esto a la bacteria evadir la memoria inmunológica innata y adquirida del organismo huésped. Esta adhesión primaria debe poseer un carácter reversible, toda vez que esta maleabilidad patogénica le permita al microorganismo adaptarse a las condiciones cambiantes de un medio ambiente nuevo; sin embargo, una vez establecida esta asociación primaria debe darse paso a un establecimiento secundario que permita la invasión y propagación del microorganismo en el huésped, cobrando vital importancia las proteínas Opa en este momento de la relación huésped-parásito (Rauck, C. 2003). El establecimiento de la adhesión secundaria mediada por Opa es de carácter estable e irreversible, siendo los principales receptores para estas proteínas bacterianas los antígenos carcinoembriogénicos o CEA. Los miembros de la familia CEA: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 y CEACAM6, son reconocidos por proteínas Opa, mientras que CEACAM8 no esta sujeto a reconocimiento por dichas proteínas asociadas a opacidad (Popps, A. 1999). El reconocimiento de Opa a tan amplio grupo de receptores, se da mediante la presencia de varios alelos *opa* dispuestos indistintamente a lo largo del genoma bacteriano (en el caso de *Neisseria gonorrhoeae* pueden encontrarse hasta 11 alelos), los cuales son secuencialmente homólogos, pero antigénicamente distintos (Bhat et al, 1991; Kupsch et al, 1993). Cada

alelo es constitutivamente transcrito, pero su traducción varía en base a cambios en el marco de lectura, estos cambios son determinados mediante pentámeros repetidos localizados en la secuencia líder (Stern et al, 1986) Es esta variación traduccional la que permite la generación de una población *Gonococcal* genotípicamente uniforme, pero fenotípicamente heteróloga respecto a la presencia de Opa, pudiéndose encontrar en un cultivo *Gonococcal* bacterias que expresen una, varias o ninguna variantes Opa, lo que permite el reconocimiento de distintos receptores CEA (en distintas líneas celulares) por parte de un mismo cultivo de *Neisseria gonorrhoeae* (Popp, A.1999). Una vez reconocido el receptor CEA por parte de Opa, establece una asociación de carácter adherente íntima e irreversible, prosiguiendo con el agrupamiento de otros receptores CEA adyacentes al sitio de unión inicial Opa-CEA, resultando en la modificación del citoesqueleto eucarionte, permitiendo así su introducción por pinocitosis. Se ha reportado que las bacterias *Gonococcales* internalizadas mediante Opa se encuentran rodeadas por fibronectina y vitronectina dentro de la célula eucarionte (Popp, A.1999).

Transferencia genética y Evolución molecular:

Los genomas bacterianos secuenciados (Blattner, 1997, Perna, 2001) y los estudios recientes sobre genética de poblaciones de diferentes especies (Caugant, 1993; Selander, 1987; Souza, 1994) han mostrado que si bien las bacterias se han mantenido en relativa estabilidad a nivel morfológico, los cambios en su genoma son dinámicos y continuos. Parte de este dinamismo se debe a la adquisición de secuencias de DNA las cuales pueden o no conferir nuevas características fenotípicas a la bacteria receptora. Este flujo de material genético obviamente multilateral puede darse mediante dos vías principales:

- Transferencia genética vertical: Es aquella en la cual la célula madre hereda el material genético a la progenie mediante la división celular.
- Transferencia genética horizontal: Es la transferencia de secuencias de DNA mediada por material genético extracromosómico (fagos, plásmidos, microvesículas, elementos insercionales)

La transferencia genética horizontal es más dinámica con respecto a la vertical en cuanto a que una secuencia de DNA puede ser transmitida no sólo a la progenie, sino a bacterias adyacentes, incluso de diferentes especies, por ejemplo, en el caso de la conjugación plasmídica, se sabe que pueden transferirse genes que confieren resistencia a antibióticos o metales pesados a la bacteria receptora, o en el caso de la infección por un bacteriófago, la transducción de elementos genéticos que son transmitidos puede referirse a genes modificantes de toxinas, adhesinas, invasinas, etc....

Aunque no se ha determinado el origen evolutivo de la Familia OMP, se sabe que el gen *lom* es el ancestro de dicha familia, por lo que es probable la existencia en otros organismos de secuencias de DNA relacionadas a *lom*.

Objetivo General:

- **Determinar la participación del gen *lom* del bacteriófago λ en la adhesión de *Escherichia coli* K12 a células bucoepiteliales humanas (CBH), y determinar la presencia o ausencia de secuencias homólogas en el cromosoma de otros bacteriófagos y bacterias.**

Objetivos Particulares:

- Determinar si el gen *lom* de λ incrementa la adhesión de *E. coli* a células bucoepiteliales humanas
- Explorar por PCR la presencia de secuencias homólogas o similares al gen *lom* de λ en el cromosoma de distintos bacteriófagos y bacterias.

Objetivo General:

- **Determinar la participación del gen *lom* del bacteriófago λ en la adhesión de *Escherichia coli* K12 a células bucoepiteliales humanas (CBH), y determinar la presencia o ausencia de secuencias homólogas en el cromosoma de otros bacteriófagos y bacterias.**

Objetivos Particulares:

- Determinar si el gen *lom* de λ incrementa la adhesión de *E. coli* a células bucoepiteliales humanas
- Explorar por PCR la presencia de secuencias homólogas o similares al gen *lom* de λ en el cromosoma de distintos bacteriófagos y bacterias.

Materiales y métodos

Bacterias y bacteriófagos.

Fueron utilizados 20 colifagos silvestres en este trabajo, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Luis Kameyama (CINVESTAV, México, DF), estos fagos fueron identificados por el criterio de inmunidad y agrupados tal como se muestran en la siguiente tabla:

Grupo de inmunidad	Bacteriófago
I	mep038
II	mep003
III	mep023
IV	mep043
V	mep064
VI	mep167
VII	mep173
VIII	mep174
IX	mep213
X	mep237
XI	mep390
XII	mep410
XIII	mep457
XIV	mep460
XV	mep506
XVI	mep505
XVII	mep535
XVIII	W-I , mep123
XIX	Φ80
XX	HK022

Otros bacteriófagos de *E. coli* utilizados en este trabajo fueron: λ^+ , λ *plac5 cI₈₅₇, 933W* y *P-EIBA* (donados por Gabriel Guarneros, CINVESTAV, México, DF), y λ 16-25 *lom⁺ bor⁺*, λ 16-25 *lom⁺ bor::TnphoA*, λ 16-25 *lom::TnphoA bor⁺* (donados por J. Beckwith, Harvard Medical School, Boston, MA.).

Las cepas de *E. coli* K12 utilizadas en este trabajo fueron: C600 (F- *thi-1 thr-1 leuB6 supE44 lacY1 tonΔ21 supE44*), C600 (λ), *ECOR-9* (donadas por G. Guarneros), AB1157 y sus lisógenas (donadas por J. Beckwith) y W3110 (F- *LAM- IN(rrnD-rrnE)1 rph-1*), DH5 α (ϕ 80*dlacZΔM15,recA1,endA1,gyrA96,supE44,relA1,deoR,Δ(lacZYA-argF)*), HB101(*thi-1,hsd20(r_B⁻,m_B⁻,supE44,recA13,ara-14,leuB6,proA2,lacY1,galk2rpsL20,F'-,K99-*), TOP10 (F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*) y JM101 (*supE,thi,Δ(lac-proAB), F',lacI^qZΔM15*) (colección de nuestro laboratorio).

Las cepas clínicas de *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* y *Klebsiella spp.* fueron aisladas a partir del tracto digestivo de *Chirostoma humboldtianum*; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* son aislados clínicos humanos. Todas las anteriores fueron donadas por Gloria L. Paniagua (CUSI, FES Iztacala, UNAM, México).

Las cepas aisladas de campo *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum* A6 y *Actinobacillus pleuropneumoniae* 5b fueron proporcionadas por el laboratorio BIOVETSA (Tehuacán, Puebla.). *Mannheimia haemolitica* fue donada por Francisco Morales (INIFAP, México).

Las cepas *Haemophilus influenzae* tipo b y *Brucella abortus* fueron donadas por Rosa del Carmen Rocha y Elsa Castañeda Roldan respectivamente (ICUAP, Puebla, México).

La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) donó las siguientes cepas: *Aeromonas hydrophyla* (CECT #398), *Aeromonas trota* (CECT #4255), *Aeromonas bestiarum* (CECT #4227), *Aeromonas caviae* (CECT #4222), *Aeromonas enteropelogenes* (CECT #4487), *Aeromonas sobria* (CECT #4246) y *Serratia marcescens* (CECT #846T).

La cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* y el bacteriófago temperado D3 fueron donados por B.W. Holloway, Monash University, Australia. El fago FIZ15 fue aislado en nuestro laboratorio a partir de un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* obtenido de una herida infectada.

Los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo fueron los siguientes: pUC19 (ori pMB1 amp^r plac lacZ M13 polylinker) pUC18 (ori pMB1 amp^r plac lacZ mP18 polylinker) (Gibco co.), pKQV4 (ori pMB1 bla ptac lacZ lacIq) (G. Olmedo, CINVESTAV, México), pCR2.1 TOPO TA cloning Kit (ori pMB1 amp^r tet^r plac lacZ mP18 polylinker (Invitrogen) y pGFPuv (ori pMB1 amp^r mP18 polylinker plac gfpuv) (Clontech Inc.). Las construcciones pUC18*lom*, pVM102 ó pBR322*ail*, pUC18*rck* y pUC18*ail* fueron donados por S. Falkow (NY University, NY).

Reactivos, soluciones y medios de cultivo:

Todos los medios utilizados para crecer las bacterias se obtuvieron de Merck y Bioxón de México. Estos fueron: Caldo nutritivo (CN), Caldo Luria (LB), Agar nutritivo (AN), Caldo de soya y tripticasa (CST), Agar de soya y tripticasa (AST). El Agar suave

(AS) para plaquear los fagos fue CN con 0.6% de Agar bacteriológico. Los experimentos de adhesión se efectuaron en Tris-HCl 0.1 N, pH 7.2 (Sigma Chemical Co.).

Buffer TE (10 mM Tris HCl pH 8.5; 1 mM EDTA); Solución de precipitación (Polietilenglicol 8000 al 10% en NaCl 2.5 M); SM (NaCl 0.58g, MgSO₄ 0.2g, 5ml Tris-HCl 1M pH 7.5, 0.5 ml gelatina al 2%, todo se mezcla, se afora a 100 ml y se esteriliza).

- Buffer de lisis para extracción rápida de DNA plasmídico:

10mM Tris-HCl pH 8.0

1 mM EDTA

0.1 mg/ml BSA

0.2 mg/ml RNAsa A

15% sacarosa

2 mg/ml lisozyma

- Buffer de lisis para extracción de DNA cromosómico:

Tris-acetatos 40mM pH 7.8

Na Ac 20mM

EDTA 1mM

SDS 1%

RNAsa 10mg/ml

- Fenol: Cloroformo

Mezclar cantidades iguales de fenol y cloroformo. Equilibrar la mezcla extrayéndola varias veces con 0.1 mM Tris-HCl (pH 7.6). Almacenar la mezcla equilibrada bajo un volumen de 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6) a 4° C en botellas de vidrio.

- Soluciones para extracción de DNA plasmídico a pequeña escala:

Solución I Esterilizada

50 mM de glucosa

25 mM de Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

La solución puede ser preparada en lotes de aproximadamente 100 ml, esterilizada sin agregar glucosa a 10 lb./in² y almacenada a 4° C. La glucosa debe ser esterilizada por filtración y agregada posteriormente.

Solución II Esterilizada

0.2 N de NaOH (Diluida a partir de una solución 10 N)

1% de SDS

Solución III Esterilizada

5 M de acetato de potasio 60 ml

Ácido acético 11.5 ml

H₂O 28.5 ml

El resultado de la solución es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato

- TBE 5X

54 g Tris-base

27.5 g ácido bórico

20 ml EDTA 500mM pH 8

Se afora a 1 lt

Métodos:

Obtención de lisados fágicos:

Se obtuvieron placas aisladas del fago plaqueado sobre la cepa receptora en medio sólido, posteriormente con ayuda de una pipeta pasteur estéril se extrajo una placa y se resuspendió en 10 ml de CN y 0.2 de un cultivo de bacteria sensible crecido durante toda la noche (ON); esta suspensión se incubó a 150 r.p.m. a 37°C y se midió absorbancia del cultivo durante 5 h. Al observarse un decaimiento de la absorbancia de aproximadamente 75%, se agregaron 20 µl de cloroformo y se incubó durante otros 15 minutos, al término se centrifugó a 15,000 r.p.m. /15 min. en microcentrífuga y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril para su almacenamiento a 4°C protegiéndolo de la luz directa (Maniatis,1989).

Titulación de lisados:

A partir de los lisados de fagos obtenidos se realizaron las siguientes diluciones en CN: 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Se tomó 0.1 ml de cada dilución y se mezcló con 0.2 ml de un cultivo de bacteria sensible crecida ON y 3 ml de AS; se plaqueó el contenido sobre cajas con AN y se incubó a 37°C / 12h. Posteriormente se contó el número de placas de cada dilución, y se estimó el título utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{*ufp/ml} = (\text{no. Placas}) / (\text{vol}) (\text{dil})$$

*ufp= unidades formadoras de placa

Ensayo de adhesión

La adhesión de *E.coli* K12 a células bucoepiteliales humanas se realizó por una modificación de los métodos descritos por Woods (1980) y Reid (1983). Las CBH se obtienen de donadores adultos sanos por raspado de la mucosa oral con isopos estériles. Las células se lavan tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2, para eliminar las bacterias indígenas

y se colectan por centrifugación a 150 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión celular se lava por centrifugación y ajusta a 5×10^4 CBH/ml por conteo en una cámara de Neubauer. Previamente, las bacterias se crecen en AST durante 18 h a 37°C o 18°C según sea el caso, se colectan y se lavan tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2. La suspensión bacteriana se ajusta a 5×10^6 bacterias/ml por medición de la absorbancia a 590 nm.

Para el ensayo de adhesión se mezcla 1 ml de CBH con 1 ml de la suspensión bacteriana y la mezcla se incuba en un baño con agitación orbital a 37, 30 o 18°C / 50 r.p.m. durante 2 h. La mezcla se lava tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 para eliminar las bacterias no adheridas. Después del primer lavado se agregan dos gotas de eritrosina β (0.4 %) y una alícuota de la suspensión final se utiliza para preparar un frotis el cual se tiñe con azul de metileno al 0.4 %. El frotis se observa por microscopía óptica y se cuenta y promedia el número de bacterias adheridas a cada una de 40 CBH. En cada experimento se incluye un control de CBH al que no se le añadieron bacterias, para estimar el número de bacilos indígenas adheridos (usualmente 1-3 por CBH).

Ensayo de invasión.

El ensayo de invasión utilizado en este trabajo fue diseñado en el laboratorio de genética de la UMF por el autor de este trabajo, y se divide en dos partes:

- a) Inserción cromosómica del gen *gfpuv* en E.coli K12 TOP10
- b) Ensayo de invasión bacteriana a CBH

Inserción cromosómica del gen *gfpuv* en *E. coli* K12 TOP10.

A partir del plásmido pGFPuv (Clontech Inc.) se escindió por restricción durante 1 hora / 37°C con SapI y EcoRI el gen *gfpuv*, incluyéndose en esto el promotor *plac*, siendo purificado el fragmento liberado a partir de un gel de electroforesis en agarosa al 1%.

Paralelamente, se linearizó el plásmido *pUC18* (100 ng) con las mismas endonucleasas de restricción mencionadas anteriormente y defosforiló con 1 ud de fosfatasa alcalina de ternera (CIP) durante 30 min., al término, se inactivó la reacción 15 min. a 70°C y se purificó por precipitación etanólica (2 vol) y 1/10 vol. de Acetato de potasio 5M pH 8.0, resuspendiéndose el DNA en 10 µl de TE. Posterior a esto, se realizó la ligación intermolecular de *pUC18* /*SapI*/*EcoRI* y *plac gfpuv* a un radio 1:3 con 1 ud Weiss T4 ligasa, proporcionándose ciclos de 30 s / 30°C y 30s / 10s durante 16 hrs. Al término se incluyó un ciclo de 15 minutos a 65°C a fin de inactivar la reacción. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes TOP10 preparadas por el método de cloruro de calcio (Sambrook et.al. 1989) y se plaquearon en medio A.N. + amp₁₀₀, incubándose el cultivo 16-24 hrs. a 37°C. Las colonias recombinantes fueron seleccionadas por visualización a 260 nm en condiciones de esterilidad.

Utilizando la técnica de lisis alcalina se extrajo DNA plasmídico de una de las colonias tamizadas y se escindió un fragmento interno del origen de replicación pMB1 por corte con *HphI* y *CaiI* / 1h., el plásmido linearizado se purificó a partir de un gel de agarosa al 1% y se recircularizó con 1 unidad Weiss de T4 Ligasa proporcionándose condiciones de ciclado de 30 s / 30°C y 30s / 10°C durante 16 hrs. Al término se incluyó un ciclo de 15 minutos a 65°C a fin de inactivar la reacción. Con esta ligación intramolecular se transformaron células competentes TOP10, e incubaron a 37°C durante 16 hrs., lapso durante el cual se favoreció la recombinación de la región plasmídica quimérica *lacZ::plac/gfpuv::lacZ* con la región cromosómica $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ del genoma de TOP10. Las colonias recombinantes fueron tamizadas por visualización UV a 260 nm y escrutinadas de acuerdo a pérdida de resistencia para amp₁₀₀. Se confirmó la ausencia en TOP10 de la construcción

pUC18 lacZ:: plac/gfpuv ΔpMB1 por miniprep en el 10% de las colonias escrutinadas. Se confirmó la inserción cromosómica de *plac/gfpuv* en el genoma de TOP10 por extracción de DNA genómico de ésta y amplificación de *gfpuv* utilizando oligonucleótidos complementarios al extremos 5' y 3' del gen *gfpuv*.

Ensayo de invasión a CBH.

Las CBH se obtienen de donadores adultos sanos por raspado de la mucosa oral con hisopos estériles. Las células se lavan una vez por centrifugación a 1750 r.p.m. / 15 min., con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2, a fin de eliminar los restos de saliva y otros contaminantes. La suspensión celular se ajusta a 5×10^4 CBH/ml por conteo en una cámara de Neubauer. Previamente, las bacterias que expresen la GFP se crecen en AST durante 18 h a 37°C, se colectan y lavan tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2. La suspensión bacteriana se ajusta a 5×10^6 bacterias/ml por medición de la absorbancia a 590 nm. Al término, se mezcla 1 ml de CBH con 1 ml de la suspensión bacteriana y la mezcla se incuba en un baño con agitación orbital a 37°C / 30 r.p.m. durante 3 h. al término se agrega un exceso de gentamicina a una concentración final de 50 µg/ml a fin de lisar las bacterias adheridas a la superficie celular, se incuba durante 20 min. a 37°C y se lava por centrifugación con 2 ml de Tris-HCl 0.1 N pH 7.2. Se realiza un frotis en portaobjetos y se visualiza la preparación por microscopia de fluorescencia a una longitud de onda de 260 nm y se cuenta el número de bacterias que expresen GFPuv internalizadas en cada una de 40 CBH.

Extracción de DNA de bacteriófagos.

Para la extracción de DNA fágico, se siguió la metodología de lisados fágicos en placa confluyente en medio sólido de agarosa descrita por Sambrook et.al. 1989. Esta técnica presenta la conveniencia de generar lisados de fago con alto título (10^{10} ufp), para esto se inoculan 10^5 ufp (o 50 μ l de una placa resuspendida en 1 ml de SM) con 100 μ l de bacteria sensible proveniente de un cultivo de toda la noche, la mezcla se incubó por 20 min a 37°C; posteriormente se plaqueó la mezcla con 3 ml de AS sobre medio sólido a temperatura ambiente. Las placas se incubaron hasta lisis total (alrededor de 8 h) hasta que se observó confluencia entre las placas del lisado. Posteriormente se añadieron 5 ml de SM y se incubaron las placas a 4°C durante varias horas (aproximadamente 6 h) con agitación. Al término la suspensión se colectó con pipeta y se enjuagó la superficie de la caja con 1 ml extra de SM manteniendo de lado las cajas durante 1 minuto y colectando el SM sobrante por aspiración con pipeta. A este lisado se le añadió 0.1 ml de cloroformo y se incubó en agitación durante 15 minutos, al término se centrifugó a 15,000 r.p.m. / 10 min / 4°C, se decantó el sobrenadante a tubos nuevos estériles y se tituló, esperando un título de 10^9 ufp, el cual es el idóneo para su precipitación. Para llevar a cabo la precipitación se añadieron 4 ml de solución de precipitación por cada 30 ml de lisado y se incubó el tubo a 4°C durante toda la noche en posición vertical, o en un baño agua-hielo durante 3 h., al término se centrifugó durante 20' a 4°C / 15,000 r.p.m. , al término se eliminó el sobrenadante y se invirtieron los tubos sobre un lienzo de papel a fin de eliminar lo mas posible los restos de PEG-8000, ya que este puede inhibir reacciones enzimáticas posteriores. La pastilla de cada tubo se resuspendió en 250 μ l de agua desionizada estéril y el contenido de ambos se reunió en un tubo eppendorf estéril nuevo. La solución se incubó a 37°C con DNAasa (5 μ g/ml) y RNAasa (1 μ g/ml) durante 5 min. Posteriormente se incubó la preparación a 65°C durante

10 min. y a 0°C durante otros 10 min. Después se agregaron 250 µl de buffer TE y a continuación se agregaron 250 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex a nivel medio por 2 min. Se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 2 min. a temperatura ambiente. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo eppendorf estéril nuevo. Se agitó en vortex 2 min. a nivel medio y después se microcentrifugó durante 2 min. a temperatura ambiente y la fase acuosa se transfirió a otro tubo de microfuga. Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto helado; se mezcló por inversión varias veces y se dejó precipitar el DNA a -20°C durante 1 h. Se centrifugó a 15,000 r.p.m. /15 min. a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por centrifugación con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 100 µl de agua inyectable estéril. La integridad del DNA extraído se analizó en geles de agarosa al 0.8% (TBE 0.5X, 120 volts, 94 mA, 35 min), y se incluyeron 500 ng de DNA de lambda (Sigma) y 500 ng de λ *Hind* III a fin de verificar por densitometría óptica el peso molecular y la concentración del DNA extraído (Maniatis, et.al 1989).

Extracción rápida de DNA plasmídico:

Se centrifuga 1.5 ml de cultivo ON y se desecha el sobrenadante, el paquete celular se resuspende en 50 µl de buffer de lisis y se incuba 5 min a temperatura ambiente, al término los tubos se hierven en baño maría durante 1 minuto, después se transfieren a hielo durante un minuto para posteriormente centrifugarse durante 10 min/ 12,000 r.p.m. /4°C. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo y se le agrega un volumen de etanol frio al 100%, mezclar por inversión 30 veces y se centrifuga a 12,000 r.p.m. /4°C/ 10 minutos, al término se extrae el sobrenadante por aspiración con micropipeta y se realizan dos lavados con

etanol 70% a temperatura ambiente. Al término, se seca la pastilla a 65 °C / 3 minutos y se resuspende en 20 µl de agua desionizada estéril o MQ (Maniatis, et.al 1989).

Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala

Este protocolo es una modificación de los métodos de Birnboim y Doly (1979) y Ish-Horowicz y Burke (1981). Transfiera una colonia de bacterias a un tubo de ensaye que contenga 2 ml de medio de cultivo con el antibiótico apropiado. Incubar el cultivo por toda la noche a 37° C con vigorosa agitación. Verter 1.5 ml del cultivo dentro de un tubo de microfuga. Centrifugar a 12,000 r.p.m por 30 segundos a 4 °C. Almacenar el resto del cultivo a 4° C. Remover el medio (sobrenadante) por aspiración, dejando la pastilla celular tan seca como sea posible. Resuspender el paquete celular en 100 µl de la solución I fría, por agitación vigorosa en vortex. Agregar 200 µl de la solución II. Cerrar el tubo perfectamente, y mezclar el contenido por rápida inversión del tubo, 5 veces. Agregar 150 µl de la solución III fría. Cerrar el tubo y mezclar con cuidado en vortex en posición invertida por 10 s para dispersar la solución II a través del medio viscoso de las bacterias lisadas. Almacenar en hielo por 3-5 min. Centrifugar a 12,000 r.p.m. por 5 min a 4° C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Opcional: Agregar un volumen igual de fenol: cloroformo. Mezclar por vortex. Centrifugar a 12,000 r.p.m. por 2 min a 4° C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Precipitar la doble cadena de ADN con 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Mezclar por vortex. Permitir que la mezcla se posicione (repose) por 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12,000 r.p.m por 5 min a 4° C. Remover el sobrenadante mediante aspiración cuidadosa. Poner el tubo en una posición invertida sobre papel para que todo el fluido drene. Remover el fluido adherido a las paredes del tubo. Enjuagar la pastilla de la doble cadena de ADN con 1 ml de etanol al 70%

a 4° C. Remover el sobrenadante como se describió en el paso 8 y permitir que la pastilla de ácido nucleico seque a temperatura ambiente durante 10 min. Redisolver el ácido nucleico en 50 µl de TE (pH 8.0) libre de DNAsa y conteniendo RNAsa pancreática (20 µg/ml). Mezclar brevemente en vortex. Almacenar el DNA a -20° C.

Extracción de DNA Genómico de Bacterias:

Centrifugar 1.5 ml de un cultivo saturado de la bacteria en cuestión (12,000 r.p.m. / 1min). Retirar el sobrenadante y resuspender por pipeteo vigoroso en 200 µl de regulador de lisis. Incubar a 37°C durante 15 min. Agregar 66 µl de NaCl 5M (para eliminar la mayoría de los detritos celulares), mezclar bien por inversión y centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 10min a 4° C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar un volumen de cloroformo-alcohol isoamilico 24:1 (alternativo antes del cloroformo, se puede agregar un volumen de fenol pH 8 y retirar el fenol residual con cloroformo). Agitar por inversión por lo menos 50 veces, hasta formar una suspensión. Centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 3min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar agregando el doble de volumen de Etanol absoluto helado, lavar dos veces con 500 µl de etanol al 70%, secar la pastilla durante 1min a 65°C y resuspender en 50 µl de TE 10:1 ó agua desionizada estéril.

Preparación de células competentes y transformación de DNA plasmídico:

Se inoculan 5 ml de medio de crecimiento con una colonia aislada de la bacteria deseada, se incuba ON en el medio de crecimiento y temperatura adecuadas; para *E.coli* DH5α, JM101 y HB101 se incuba de 12 -16 hrs. en medio LB a 37°C / 200 r.p.m en baño orbital de agitación. Al término se inoculan 30 ml de LB en un matraz de 250 ml con 1 ml del cultivo previo, se incuba la mezcla a 37°C / 200-300 r.p.m. en baño orbital de agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 600 nm (aproximadamente 2 h para DH5α

y HB101); al llegar a la densidad óptica deseada el cultivo se enfría cubriendo el matraz con hielo durante 15 minutos, al término, se divide el cultivo en 2 tubos corex o falcon y se centrifuga el cultivo a 7000 r.p.m. / 10 min / 4°C. Descartar el sobrenadante rápidamente y se resuspende el paquete celular de cada tubo en 15 ml de CaCl₂ 0.1M estéril frío. Se incuba en hielo de 2 a 4 h., al término, se centrifuga el cultivo a 7000 r.p.m. / 10 min / 4°C, descartar el sobrenadante rápidamente y se resuspende el paquete celular en 2 ml de CaCl₂ 0.1M estéril frío y se adicionan 340 µl de glicerol 100% estéril frío. Se alicuotan 120 µl de la suspensión bacteriana en tubos de microfuga o nanofuga y se congelan en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -70°C (Maniatis, et.al 1989).

Transformación de DNA plasmídico:

Se descongelan en hielo 120 µl de células competentes y se les agregan entre 100 y 500 ng de DNA mezcla de ligación, en el caso de plásmido superenrollado se agregan 50 ng de DNA y se incuba durante 30 min en hielo. Al término se da un choque térmico a la mezcla a 42°C durante 2 minutos exactamente y se le agrega posteriormente 1 ml de LB sin antibiótico, se incuba en agitación (100-200 r.p.m.) durante 60 minutos en tubo de cultivo y se espatulan 100 µl del cultivo en el medio de crecimiento y selección adecuado. Es conveniente plaquear el resto del cultivo en otra caja concentrando por centrifugación a un volumen final de 100 µl (Maniatis et.al 1989).

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa:

Este método es modificación de una técnica no publicada realizada en el laboratorio de la Dra. Gabriela Olmedo Álvarez (CINVESTAV U. Irapuato, México). Se realiza una electroforesis de la muestra deseada en agarosa de bajo punto de fusión (LMP) a 4°C, en un carril se coloca una alícuota de dicha muestra y en otra el resto, es decir la mayor cantidad,

posteriormente utilizando una navaja de bisturí estéril se corta el carril donde se corrió la alícuota y se tiñe con bromuro de etidio. Después, se alinea sobre el transiluminador la sección del gel teñida a un lado de la no teñida, ésta última sobre una hoja de papel (libre de cloro) a fin de protegerla de la radiación UV, se visualiza la banda deseada y se corta a la misma altura en el segmento no teñido depositándose en un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril, donde se macera utilizando una pipeta pasteur con la punta recortada y sellada al mechero, después se congela a -70°C / 15 min, se descongela a 65°C y se agrega un volumen de fenol: cloroformo a temperatura ambiente, se agita en vortex 30 segundos y se congela la muestra a -70°C / 15 min. Se descongela la muestra nuevamente a 65°C y después se centrifuga a 15,000 r.p.m. / 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfiere a otro tubo, se extrae con un volumen de éter y se precipita con un volumen de etanol absoluto helado y 1/10 vol de acetato de amonio 5M pH 8.0 y se lava dos veces con etanol al 70% a temperatura ambiente. Al final la pastilla se seca a 65°C / 3 minutos y se resuspende en 20 μl de agua d.i. estéril.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y clonación del gen *lom*:

La estrategia para amplificar, clonar y expresar a λ *lom* fue la siguiente: Se sintetizaron oligonucleótidos complementarios a la cadena superior e inferior del gen *lom*, flanqueando a partir del codón de inicio (oligonucleótido superior) hasta el codón de término de la transcripción (oligonucleótido inferior), añadiendo al oligonucleótido superior un sitio de corte para EcoRI y al inferior uno para HindIII. Una vez obtenido el producto por PCR se visualizó por electroforesis en agarosa al 1% y a partir de ahí se purificó el DNA, posteriormente, se clonó al vector pUC19 y se secuenció, este fragmento fue subclonado al plásmido pKQV4 dando como resultado la construcción pOSlom.

Metodología para la amplificación y clonación del gen *lom*:

Para amplificar el gen *lom* de λ se diseñó 1 par de oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' (a partir del codón de inicio) y 3' (hasta el codón de término de la transcripción) de la secuencia reportada para el gen *lom* del bacteriófago λ en GeneBank (No. Acc. AY342370, X55793). Se añadieron los sitios de reconocimiento para EcoRI (*lomupper*) y BamHI (*lomlower*). La secuencia de los primers diseñados fue la siguiente:

5' agagagaattcatgcgtaatgtgtgtatt 3' primer lomupper

5' tttttaagcttttagaattataaccgaccca 3' primer lomlower

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes:

DNA λ (500ng/ μ l)	200 ng
Primer upper	25 pmoles
Primer lower	25 pmoles
dntp mix (2.5mM c/u)	10mM
PCR Buffer 10x	1X
Platinum pfx 2.5 ud/ μ l	1.25 ud
H ₂ O d.i.	Aforar a 50 μ l

Las condiciones de tiempo y temperatura fueron:

94°C	5 min	1 ciclo
94°C	30 seg	
57°C	30seg	25 ciclos
68°C	45seg	
68°C	5 min	1 ciclo

Se obtuvo el gen *lom* a partir de DNA de λ amplificando con oligonucleótidos dirigidos al extremo 5' y 3' del gen *lom*. Tanto el producto de amplificación como el vector de clonación pUC19 fueron cortados por restricción a fin de exponer los extremos cohesivos *EcoRI* y *BamHI* mediante la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Conc. Final
Buffer cuts all 10X	1X
EcoRI 5ud/ml	1ud
BamHI 5ud/ml	1ud
<i>lom</i> 100ng/μl	700 ng
H ₂ O d.i.	Aforar a 10 μl

Componente	Conc. Final
Buffer cuts all 10X	1X
EcoRI 5ud/ml	1ud
BamHI 5ud/ml	1ud
pUC19 100ng/μl	500 ng
H ₂ O d.i.	Aforar a 10 μl
CIB 1ud/μl	1ud

Se incubaron las mezclas a 37°C / 1hr.; al término, se inactivaron las reacciones a 70°C / 10 min y por adición de 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1), se agitó la mezcla en vortex 30 segundos y se centrifugó a 15,000 r.p.m. / 5 minutos. Se recuperó el DNA transfiriendo la fase acuosa a otro tubo y se cuantificó por densitometría en electroforesis de agarosa al 1% (TBE 0.5X, 120 volts, 94 mA, 35 min) utilizando como marcador de peso molecular λ HindIII (500ng/μl). La inducción de la expresión del constructo pOS*lom* se realizó por duplicado, agregando IPTG 0.1 mM ó 1.0 mM (concentración final) respectivamente, utilizando como control al plásmido sin inserto durante el periodo de crecimiento en AST. La mezcla de DNA recombinante se transformó a *E. coli* K12 mediante la técnica de Cloruro de Calcio reportada por Sambrook et.al. en 1989, el medio de selección fue AN+amp¹⁰⁰ (100μg/ml), en el caso de las transformantes portadoras de la construcción pUC19*lom*, se seleccionaron colonias β-galactosidasa positivas y β-galactosidasa negativas agregando 40 μl de IPTG 100mM y 40 μl de X-Gal (40μg/μl). Para realizar el escrutinio de las colonias transformantes, se extrajo DNA plasmídico de aquellas colonias β-galactosidasa negativas, las cuales se sometieron a análisis de restricción para detectar las colonias recombinantes portadoras del gen *lom*. Posteriormente, y de manera previa a la

mezcla de bacterias y CBH, se reindujo la expresión de pOSlom agregando 1mM ó 0.1mM de IPTG durante 10 minutos a 37°C en agitación.

Exploración por PCR de secuencias homólogas a *lom* en distintos cromosomas

Con el fin de rastrear, aislar, secuenciar y analizar las secuencias putativas relacionadas a *lom* en otros cromosomas, se extrajo DNA cromosómico o fágico mediante las técnicas descritas anteriormente. Se diseñaron oligonucleótidos específicos contra el extremo 5' y 3' de *lom*, la secuencia de estos primers fue la siguiente:

5'cgtaatgtgtgtattgccgttgc 3' lomupp

5' agcaaccccagccaatatttaag 3' lomlow

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

DNA	200 ng
Primer lomupp	25 pmoles
Primer lomlow	25 pmoles
dntp's 2.5mM	10mM
PCR Buffer 10x	1X
Taq 2.5 ud/μl	1.25 ud
H ₂ O d.i.	Aforar a 50 μl

Los productos de amplificación obtenidos fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (TBE 0.5X, 120 volts, 94 mA, 35 min). Algunos de los productos de amplificación fueron clonados en el vector pCR2.1 utilizando el Kit TOPO pCR2.1 TA cloning Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Secuenciación de gen *lom*, secuencias *lom*- like y miembros de la familia OMP:

Se obtuvo la secuencia del gen *lom* y las secuencias putativas “lom like”, así como de los 4 miembros de la familia *omp* clonados utilizando un secuenciador automático Genetic Analyzer Mod. 3100, la química de secuenciación empleada fue ABI Prism BigDye

Terminator Chemistry y se realizó en el laboratorio de secuenciación de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM. En el caso de los productos clonados en TOPO pCR2.1, la secuenciación se realizó utilizando los primers M13 Reverse Primer y T7 promoter. En el caso de los productos que no fueron clonados, se purificaron a partir del gel de electroforesis utilizando la técnica descrita anteriormente y se secuenciaron usando los primers lomupper y lomlower.

Los miembros de la familia omp clonados en *pUC18* se secuenciaron utilizando oligonucleótidos universales M13 forward y M13 reverse. Todas las secuenciaciones fueron realizadas por duplicado a fin de confirmar la integridad de la reacción.

Resultados

El gen *lom* del bacteriófago λ incrementa la adhesión de *E. coli* K12 a CBH

Con el propósito de averiguar el papel que desempeña el gen *lom* o cualquier otro de λ en el incremento de la adhesión de *E. coli* (λ) a CBH, se midió esta propiedad de virulencia a la cepa AB1157(λ *plac* *cI*₈₅₇), este profago presenta una sustitución de la región *b* por el operón *lac* de *E. coli*, eliminando así 1/3 del extremo 3' de *lom* y 3 ORF's río abajo. Debido al carácter termosensible del represor *CI*₈₅₇, los ensayos de adhesión realizados a esta lisógena se efectuaron a 30°C. Los valores obtenidos muestran un decremento en la adhesión mediada por λ *plac* *cI*₈₅₇ en comparación con aquella observada para AB1157 (λ +) (Tabla 1R, filas 1, 4-7), lo que indica que la región *b* de λ está involucrada en el incremento en la adhesión y que ésta a su vez no varía a 30°C con respecto a la observada a 37°C; sin embargo, debido a que no sólo está incompleto *lom* en λ *plac* *cI*₈₅₇ medimos adhesión a lisógenas portadoras de profagos mutantes por inserción del transposón *TnphoA* en *lom* y *bor*. Los valores de adhesión obtenidos muestran que el profago mutante λ 16-25 *lom*::*TnphoA* *bor*⁺ no media incremento alguno en la adhesión a CBH, mientras que en AB1157 (λ 16-25 *bor*::*TnphoA* *lom*⁺) el nivel de adhesión es comparable a los observados en la cepas AB1157 (λ ⁺) y AB1157 (λ 16-25 *lom*⁺ *bor*⁺). Al insertarse *TnphoA* en una posición del genoma de λ distinta a la de *lom* (*TnphoA*::*bor*) el incremento en la adhesión prevalece (Tabla 1R: filas 5, 7-9).

Tabla 1R: Adhesión de *Escherichia coli* K12 a CBH mediada por λ *lom*.

Cepa	Profago / Plásmido	Bacterias / CBH ^b		
		37°C	30°C	18°C
Ninguna	Ninguno	1.9 ± 0.14	2.41 ± 1.49	1.8 ± 0.46
C600	Ninguno	19.4 ± 1.50	*	2.8 ± 0.65
C600	λ +	31.0 ± 0.25	*	9.9 ± 0.65
AB1157	Ninguno	18.8 ± 1.90	21.4 ± 3.24	2.3 ± 0.08
AB1157	λ +	30.9 ± 0.15	33.4 ± 4.04	7.8 ± 0.32
AB1157	λ <i>plac cI₈₅₇</i>	*	23.8 ± 3.69	*
AB1157	λ 16-25 <i>lom+</i> <i>bor+</i>	32.1 ± 0.13	*	*
AB1157	λ 16-25 <i>lom+</i> <i>bor::TnphoA</i>	31.9 ± 0.06	*	*
AB1157	λ 16-25 <i>lom::TnphoA bor+</i>	22.8 ± 0.14	*	*
JM103	Ninguno ^a	21.4 ± 2.01	*	*
JM103	pKQV4 ^a	20.8 ± 1.17	*	*
JM103	pOSlom ^a	35.56 ± 1.90	*	*
HB101	Ninguno ^a	1.98 ± 0.23	*	*
HB101	pKQV4 ^a	1.01 ± 0.41	*	*
HB101	pOSlom ^a	13.54 ± 1.89	*	*

^a La inducción con IPTG 0.1 ó 1mM no mostró diferencias significativas en cuanto a niveles de adhesión por lo que se muestra en la tabla el promedio de ambas (véase Material y métodos).

^b Media ± desviación estándar de 3 ensayos independientes.

* Ensayos no realizados

Los niveles de adhesión a CBH mostrados por la cepa portadora del profago λ 16-25 *lom::TnphoA* son inferiores a los de *E.coli* (λ +) y similares a los de su contraparte isogénica libre de fago; sin embargo, debido a que *TnphoA* es un derivado del transposón Tn5, el cual se sabe que presenta efecto polar, decidimos clonar al gen *lom* en el plásmido pKQV4 y medir adhesión a la clona resultante a fin de sustraer a *lom* de la influencia del contexto genético de λ . Los valores obtenidos muestran que el gen *lom* clonado incrementa la adhesión de *E. coli* JM101(pOSlom) a CBH en comparación a su contraparte isogénica

carente de plásmido y a la cepa control portadora del plásmido sin *lom* (Tabla1R: filas 10-12).

Lom no depende del mecanismo de regulación de pili tipo K99.

Con el propósito de determinar si Lom es un pili tipo K99 o se regula bajo los mismos mecanismos que éstos, decidimos medir adhesión a *E. coli* K12 ($\lambda+$) y ($\lambda lom-$) en ausencia de pili, para lo cual seguimos dos estrategias: 1) Inhibir la síntesis y el ensamblaje de pili K99 realizando los ensayos de adhesión a 18°C; y 2) transformando la construcción pOSlom a la cepa HB101, la cual es incapaz de producir pili K99. Los ensayos realizados a 18°C muestran que la adhesión mediada por *lom* en C600 ($\lambda+$) y AB1157 ($\lambda+$) prevalece a esta temperatura mientras que la dada por pili K99 se abate a niveles comparables con los de la cepa control (Tabla1R: filas 1-5; Fig. 1R)

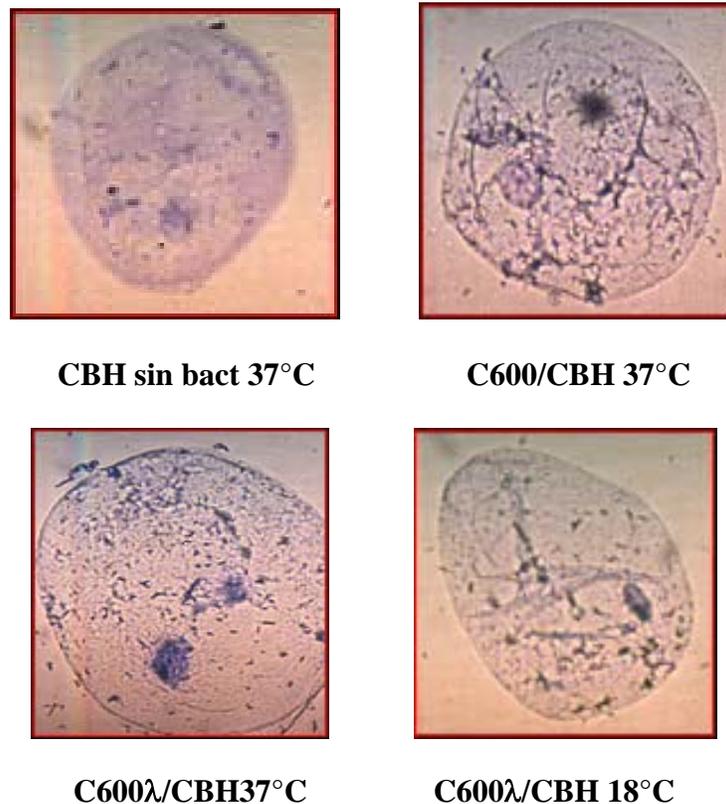


Fig. 1R: Micrografías de *E.coli* K12 adherida a CBH a distintas temperaturas

El gen *lom* favorece la invasión de *E.coli* K12 a CBH.

Al ser *lom* el ancestro del gen *ail*, relacionado con adhesión e invasión de *Yersinia enterocolitica* a células eucariontes (Heffernan, et.al 1992), decidimos evaluar el papel de *lom* en la invasión de *E.coli* K12 a CBH, para lo cual, diseñamos un método basado en el gen reportero *gfpuv* (véase material y métodos). Los resultados obtenidos muestran un incremento en la invasión de la cepa TOP10 *lacZ::gfpuv* ($\lambda+$) a CBH en comparación con la cepa no lisógena y la cepa portadora del profago λ *plac cI857* (Tabla 2R).

Tabla 2R: Invasión de *E.coli* K12 a CBH

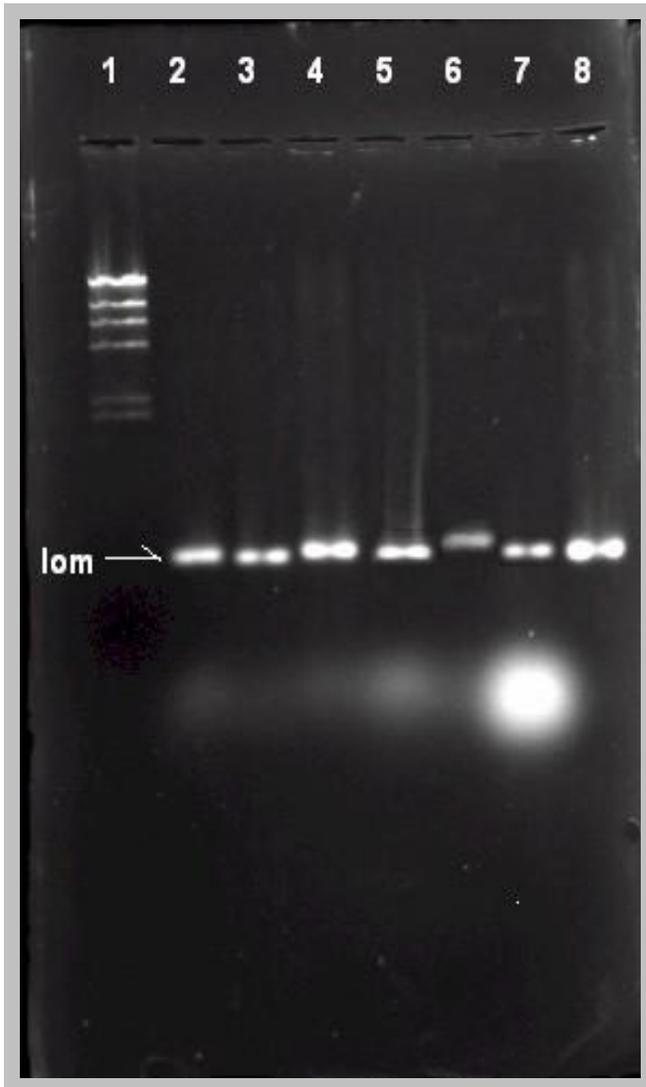
Cepa	Gen reportero	Bacteriófago	Bact/CBH
TOP10	Ninguno	Ninguno	0
TOP10	<i>gfpuv</i>	Ninguno	4 \pm 0.2
TOP10	<i>gfpuv</i>	$\lambda+$	10 \pm 0.18
TOP10	<i>gfpuv</i>	λ <i>plac cI857</i>	4.25 \pm 0.21

*Media \pm desviación standard de tres ensayos independientes

Evolución molecular del gen *lom*

Exploramos por PCR la distribución secuencias homólogas al gen *lom* en distintos cromosomas fágicos y bacterianos. Utilizando los oligonucleótidos y condiciones de PCR descritas en la sección de material y métodos se obtuvieron productos de PCR en la mayoría de los genomas bacterianos y fágicos estudiados, algunos de ellos fueron clonados para su posterior secuenciación (Figura 3R, 4R y 5R)

Fig.3R Electroforesis de productos de amplificación
lom “like” en distintos cromosomas fágicos y bacterianos



1.-MWM λ HindIII

2.- FIZ15 *lom* like

3.- mep503 *lom* like

4.- *E. coli* DH5 α *lom* like

5.- *A. pleuropneumoniae* ser. 5b *lom* like

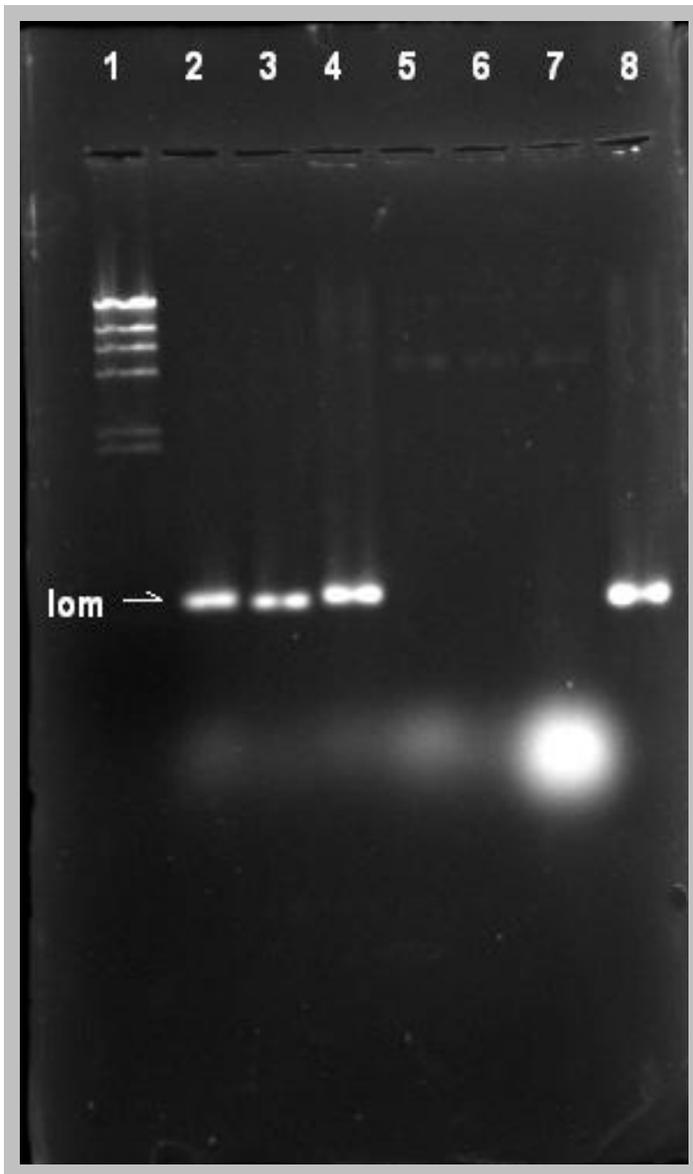
6.- *A. sobria* *lom* like

7.- *P. multocida* *lom* like

8.- λ *lom*

Agarosa 1%, TBE 0.5X, 120 V 94mA 35'

Fig.4R Electroforesis de productos de amplificación *lom* "like" en distintos cromosomas fágicos y bacterianos



1.-MWM λ HindIII

2.- *H. paragallinarum lom like*

3.- *S. aureus lom like*

4.- 933W *lom like*

5.- *P. aeruginosa*

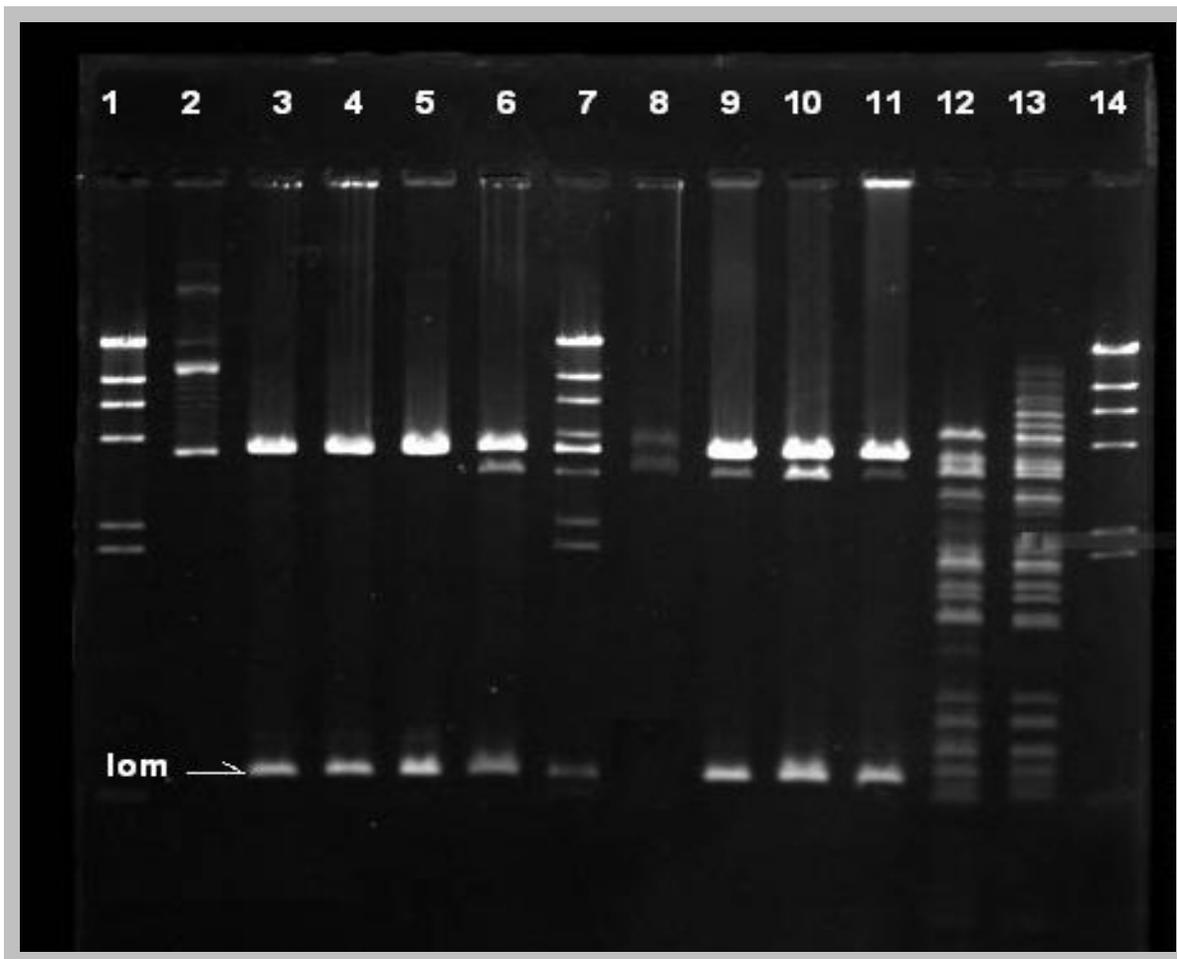
6.- *A. hydrophila*

7.- control negativo

8.-*S. marcescens*

Agarosa 1%, TBE 0.5X, 120 V 94mA
35'

Fig.5R Análisis de restricción de productos de amplificación λ *lom* y “*lom* like” clonados en pCR2.1



- 1- λ HindIII
- 2.- pCR2.1 sin cortar
- 3.- pCR2.1 λ *lom* / EcoRI/HindIII
- 4.- pCR2.1 *H. influenzae lom* like / EcoRI/HindIII
- 5.- pCR2.1 D3 *lom* like / EcoRI/HindIII
- 6.- pCR2.1 mep123 *lom* like / EcoRI/HindIII
- 7.- λ HindIII / EcoRI
- 8.- pCR2.1 EcoRI/HindIII
- 9.- pCR2.1 *A. bestiarum lom* like / EcoRI/HindIII
- 10.- pCR2.1 *A. caviae lom* like / EcoRI/HindIII
- 11.- pCR2.1 *lom* like / EcoRI/HindIII
- 12.- FIZ15 EcoRI / HindIII
- 13.- D3 EcoRI / HindIII
- 14.- λ HindIII

Agarosa 1%, TBE 0.5X, 120 V 94mA 35'

Sólo *P. aeruginosa* y *A. trota* no mostraron amplificación con los oligonucleótidos utilizados; de los demás genomas analizados a partir de los cuales si hubo amplificación, se obtuvo la secuencia de los productos de amplificación y se compararon por alineamiento en computadora con la secuencia de λ *lom* (Multialin Interface Software. Corpet F, 1988). Los productos de amplificación obtenidos a partir de DNA genómico de *S. marcescens*, 933W, *P-EIBA*, *S. aureus* y *A. caviae* poseían mayor índice de homología con otros miembros de la familia OMP. Para efectos de este trabajo nos concentraremos en aquellas que mostraron similitud significativa con *lom*. Estos fueron secuenciados y depositados en la base de datos de NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bajo los siguientes números de acceso:

Organismo fuente	GeneBank Acc.No.	Nombre	No. pb
<i>Bacteriophage λ</i>	AY342370	<i>cig</i>	621
<i>Bacteriophage FIZ15</i>	AY342371	<i>cigF</i> -like	572
<i>Bacteriophage D3</i>	AY342372	<i>cigD</i> -like	572
<i>Bacteriophage Mep503</i>	AY342373	<i>cig5</i> -like	552
<i>Escherichia coli DH5α</i>	AY342374	<i>cigDS</i> -like	576
<i>Aeromonas sobria</i>	AY342375	<i>cigAs</i> -like	593
<i>Pasteurella multocida</i>	AY342376	<i>cigP</i> -like	594
<i>Haemophilus paragallinarum A6</i>	AY342377	<i>cigHp</i> -like	759
<i>Bacteriophage Mep173</i>	AY342378	<i>cig1</i> -like	630
<i>Bacteriophage Mep123</i>	AY342379	<i>cig12</i> -like	630
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae 5b</i>	AY342380	<i>cigAp</i> -like	595
<i>Morganella morganii</i>	AY342381	<i>cigM</i> -like	616
<i>Hafnia alvei</i>	AY342382	<i>cigHa</i> -like	610
<i>Citrobacter freundii</i>	AY342383	<i>cigC</i> -like	610
<i>Escherichia coli DH5α</i>	AY342384	<i>cigDL</i> -like	1245

Las secuencias fueron alineadas individualmente entre sí mediante el software PAIRWISE BLAST (Tatiana A., 1999); las interrelaciones a nivel de similitud y divergencia de cada una de las secuencias entre sí se muestran en la matriz contenida en la Tabla 3R. Posteriormente se realizó el alineamiento de todas las secuencias como grupo tal como se

observa en la figura 6R. Se realizaron fenogramas y árboles radiales tanto de la subfamilia *lom* como de la familia *omp* en relación a la subfamilia *lom*; esto con el fin de determinar las posibles relaciones filogenéticas entre ellos (Multialin Interface Software. Corpet F, 1988).

	λlom	D3	FIZ	A.sob	P.mul	Hpa6	M173	M123	Ap5b	DH5sh	DH5lo	Mmor	Halv	Cifre	M503
λlom	S=621 I=100% G=0%	S=526 I=98% G=0%	S=544 I=99% G=0%	S=568 I=99% G=0%	S=570 I=99% G=0%	S=556 I=98% G=1%	S=561 I=99% G=0%	S=561 I=99% G=0%	S=500 I=96% G=1%	S=557 I=99% G=0%	S=557 I=99% G=0%	S=179 I=87% G=1%	S=190 I=80% G=1%	S=120 I=76% G=1%	S=552 I=100% G=0%
D3	S=526 I=98% G=0%	S=572 I=100% G=0%	S=554 I=99% G=0%	S=510 I=97% G=0%	S=504 I=97% G=0%	S=490 I=97% G=1%	S=479 I=98% G=0%	S=452 I=96% G=0%	S=478 I=95% G=0%	S=471 I=97% G=0%	S=471 I=97% G=0%	S=154 I=78% G=1%	S=180 I=79% G=0%	¹ S=59/69 I=75/ 85% G=3%/0%	S=473 I=98% G=0%
FIZ	S=544 I=99% G=0%	S=554 I=99% G=0%	S=572 I=100% G=0%	S=528 I=98% G=0%	S=522 I=98% G=0%	S=508 I=98% G=1%	S=497 I=99% G=0%	S=470 I=97% S=0%	S=496 I=96% G=0%	S=489 I=98% G=0%	S=489 I=75% G=0%	S=172 I=80% G=1%	S=192 I=79% G=0%	S=113 I=75% G=1%	S=491 I=99% G=0%
A.sob	S=568 I=99% G=0%	S=510 I=97% G=0%	S=528 I=98% G=0%	S=593 I=100% G=0%	S=541 I=98% G=0%	S=514 I=98% G=1%	S=514 I=98% G=0%	S=487 I=97% G=0%	S=478 I=96% G=0%	S=508 I=98% G=0%	S=508 I=98% G=0%	S=176 I=80% G=1%	S=189 I=80% G=0%	S=117% I=76% G=1%	S=514 I=99% G=0%
P.mul	S=570 I=99% G=0%	S=504 I=97% G=0%	S=522 I=98% G=0%	S=541 I=98% G=0%	S=594 I=100% G=0%	S=511 I=97% G=2%	S=523% I=97% G=0%	S=499 I=97% G=0%	S=493 I=96% G=1%	S=519 I=98% G=0%	S=519 I=98% G=0%	S=165 I=80% G=0%	S=188 I=80% G=1%	S=110 I=77% G=1%	S=521 I=99% G=0%
Hpa6	S=556 I=98% G=1%	S=490 I=97% G=1%	S=508 I=98% G=1%	S=514 I=98% G=1%	S=511 I=97% G=2%	S=759 I=100% G=2%	S=550 I=97% G=1%	S=523 I=96% G=1%	S=457 I=96% G=1%	S=506 I=97% G=1%	S=506 I=97% G=1%	S=170% I=80% G=1%	S=172 I=79% G=1%	S=111 I=77% G=2%	S=501 I=98% G=1%
M173	S=561 I=99% G=0%	S=479 I=98% G=0%	S=497 I=99% G=0%	S=514 I=98% G=0%	S=523% I=97% G=0%	S=550 I=97% G=1%	S=630 I=100% G=1%	S=603 I=98% G=1%	S=465 I=97% G=1%	S=541 I=98% G=0%	S=541 I=98% G=0%	S=146 I=79% G=1%	S=176 I=80% G=0%	S=88 I=75% G=2%	S=539 I=99% G=0%
M123	S=561 I=99% G=0%	S=452 I=96% G=0%	S=470 I=97% S=0%	S=487 I=97% G=0%	S=499 I=97% G=0%	S=523 I=96% G=1%	S=603 I=98% G=1%	S=639 I=100% G=1%	S=440 I=96% G=1%	S=517 I=97% G=0%	S=517 I=97% G=0%	S=110 I=75% G=0%	S=145 I=76% G=0%	S=67 I=75% G=0%	S=521 I=98% G=0%
Ap5b	S=500 I=96% G=1%	S=478 I=95% G=0%	S=496 I=96% G=0%	S=478 I=96% G=0%	S=493 I=96% G=1%	S=457 I=96% G=1%	S=465 I=97% G=1%	S=440 I=96% G=1%	S=595 I=100% G=1%	S=459 I=96% G=1%	S=459 I=96% G=1%	S=144 I=79% G=1%	S=182 I=78% G=1%	S=100 I=77% G=1%	S=469 I=97% G=0%
DH5sh	S=557 I=99% G=0%	S=471 I=97% G=0%	S=489 I=98% G=0%	S=508 I=98% G=0%	S=519 I=98% G=0%	S=506 I=97% G=1%	S=541 I=98% G=0%	S=517 I=97% G=0%	S=459 I=96% G=1%	S=576 I=100% G=1%	S=576 I=100% G=1%	S=154 I=80% G=1%	S=184 I=80% G=0%	S=96 I=78% G=2%	S=532 I=99% G=0%
DH5lo	S=557 I=99% G=0%	S=471 I=97% G=0%	S=489 I=75% G=0%	S=508 I=98% G=0%	S=519 I=98% G=0%	S=506 I=97% G=1%	S=541 I=98% G=0%	S=517 I=97% G=0%	S=459 I=96% G=1%	S=576 I=100% G=1%	S=1239 I=100% G=1%	S=145 I=78% G=1%	S=168 I=78% G=0%	S=66/51 I=79/89% G=0/6%	S=532 I=99% G=0%
Mmor	S=179 I=87% G=1%	S=154 I=78% G=1%	S=172 I=80% G=1%	S=176 I=80% G=1%	S=165 I=80% G=0%	S=170% I=80% G=1%	S=146 I=79% G=1%	S=110 I=75% G=0%	S=144 I=79% G=1%	S=154 I=80% G=1%	S=145 I=78% G=1%	S=580 I=100% G=1%	S=176 I=80% G=1%	S=216 I=82% G=1%	S=147 I=79% G=0%
Halv	S=190 I=80% G=1%	S=180 I=79% G=1%	S=192 I=79% G=0%	S=189 I=80% G=0%	S=188 I=80% G=1%	S=172 I=79% G=1%	S=176 I=80% G=0%	S=145 I=76% G=0%	S=182 I=78% G=0%	S=184 I=80% G=0%	S=168 I=78% G=0%	S=176 I=80% G=1%	S=575 I=100% G=1%	S=178 I=79% G=1%	S=186 I=80% G=0%
Cifre	S=120 I=76% G=1%	S=59/69 I=75/ 85% G=3%/0%	S=113 I=75% G=1%	S=117% I=76% G=1%	S=110 I=77% G=1%	S=111 I=77% G=2%	S=88 I=75% G=2%	S=67 I=75% G=0%	S=100 I=77% G=1%	S=96 I=78% G=2%	S=66/51 I=79/89% G=0/6%	S=216 I=82% G=1%	S=178 I=79% G=1%	S=526 I=100% G=1%	S=89% I=74% G=1%
M503	S=552 I=100% G=0%	S=473 I=98% G=0%	S=491 I=99% G=0%	S=514 I=99% G=0%	S=521 I=99% G=0%	S=501 I=98% G=1%	S=539 I=99% G=0%	S=521 I=98% G=0%	S=469 I=97% G=0%	S=532 I=99% G=0%	S=532 I=99% G=0%	S=147 I=79% G=0%	S=186 I=80% G=0%	S=89% I=74% G=1%	S=552 I=100% G=0%

Tabla3 R: Matriz de Alineamiento entrecruzado individual de secuencias *lom* like provenientes de distintos organismos.

Se presentan abreviaturas de los organismos a los cuales pertenece la secuencia *lom* like analizada.

S= score bits I=Identity percentage G=Gap percentage

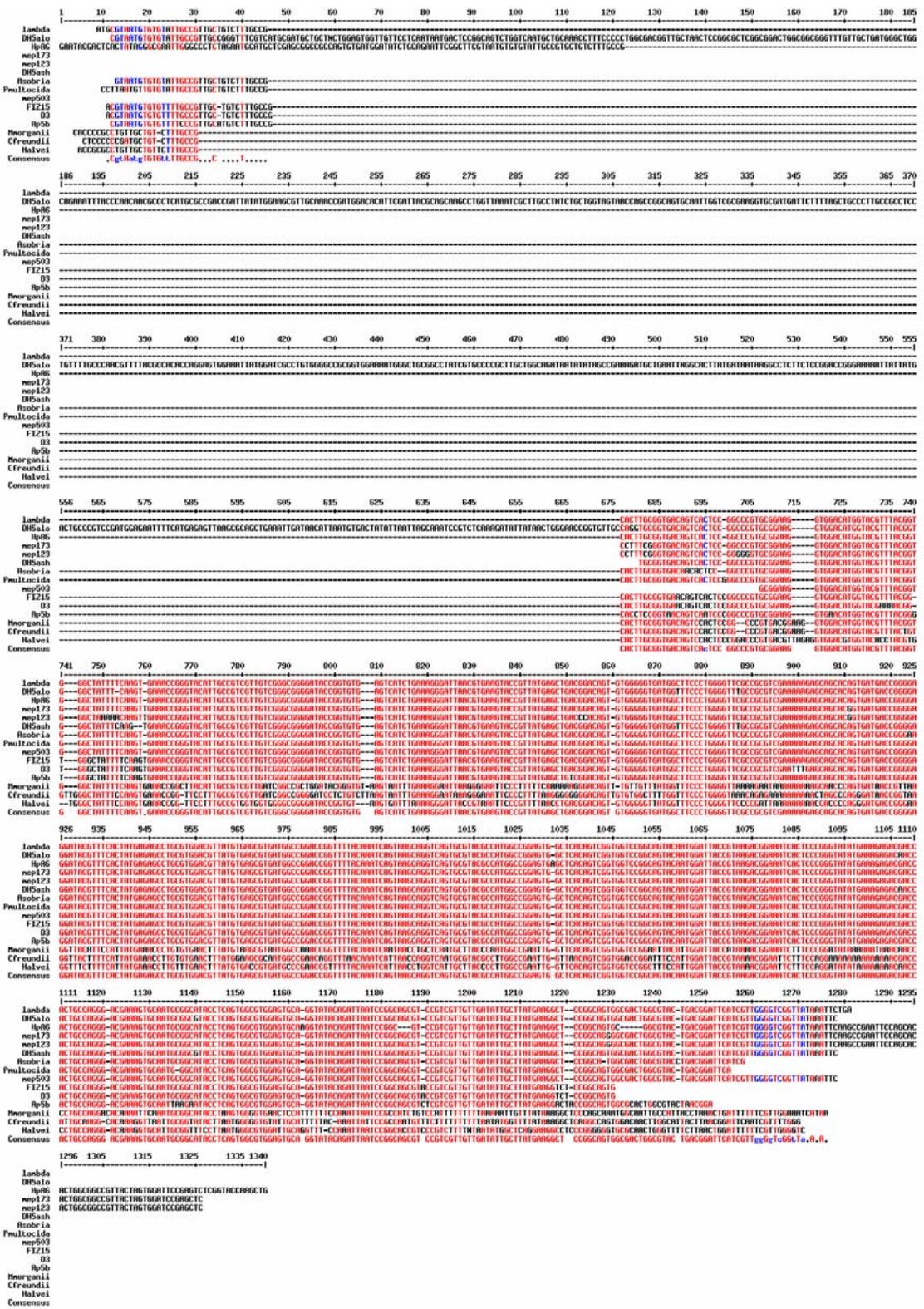
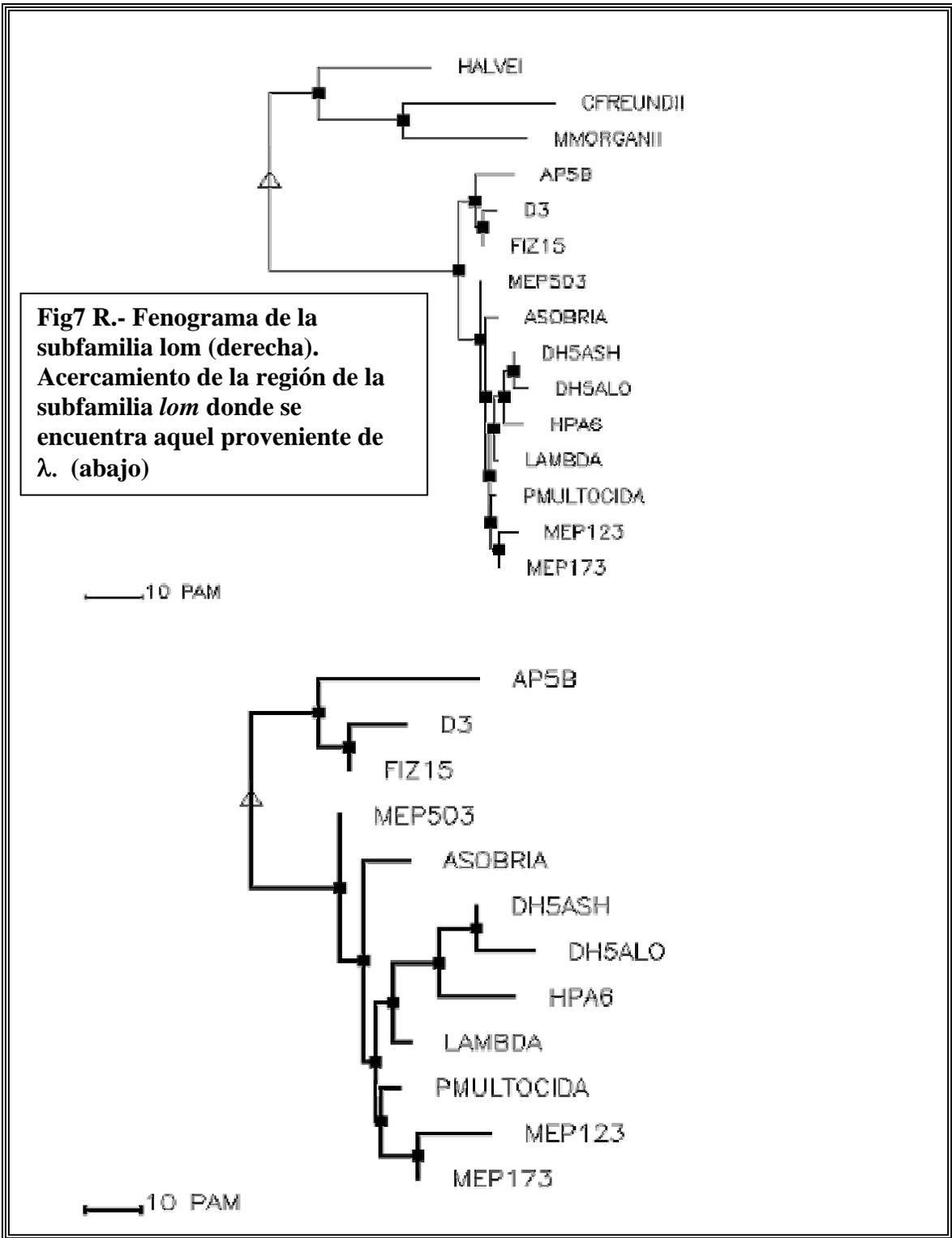
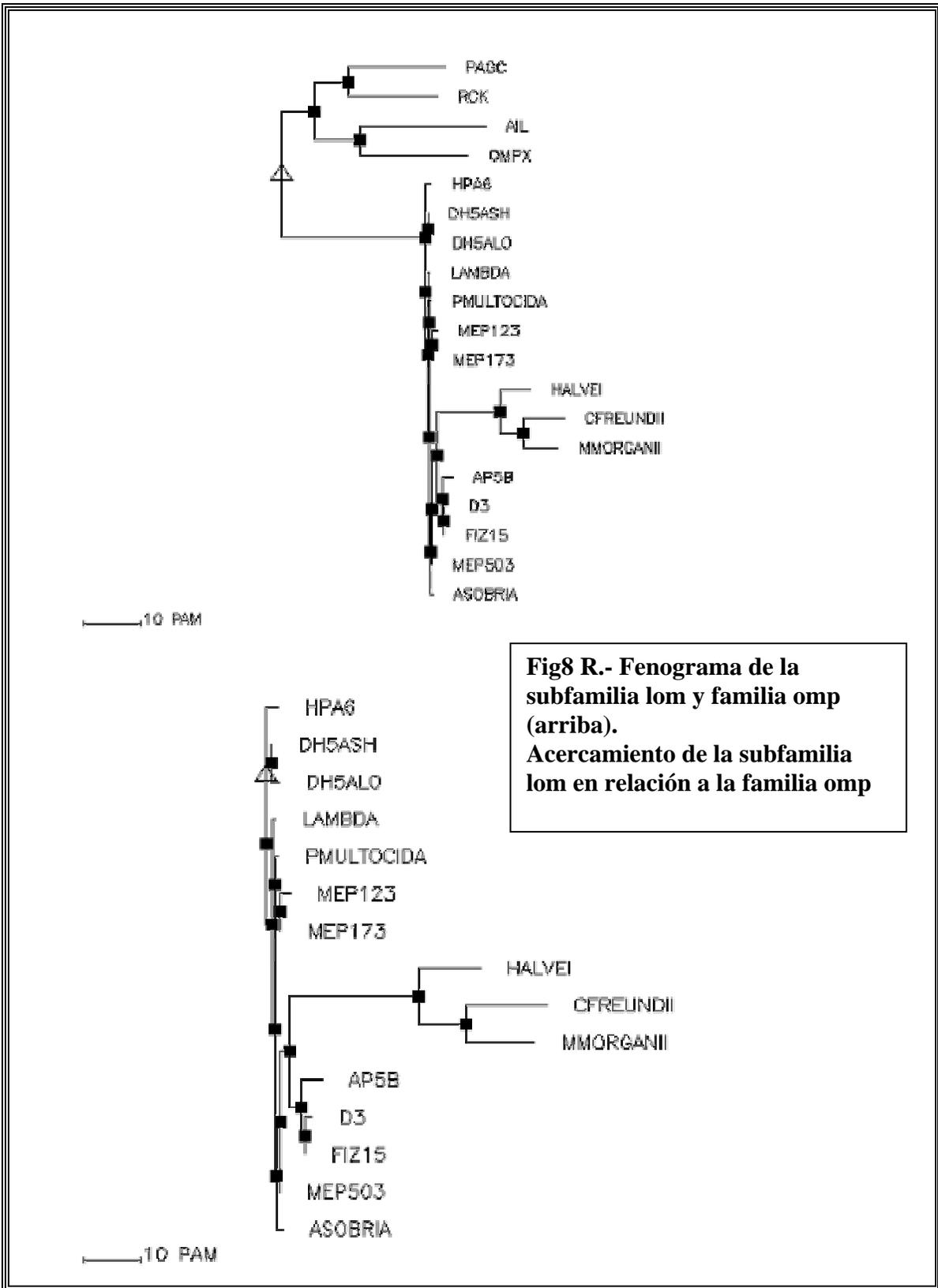
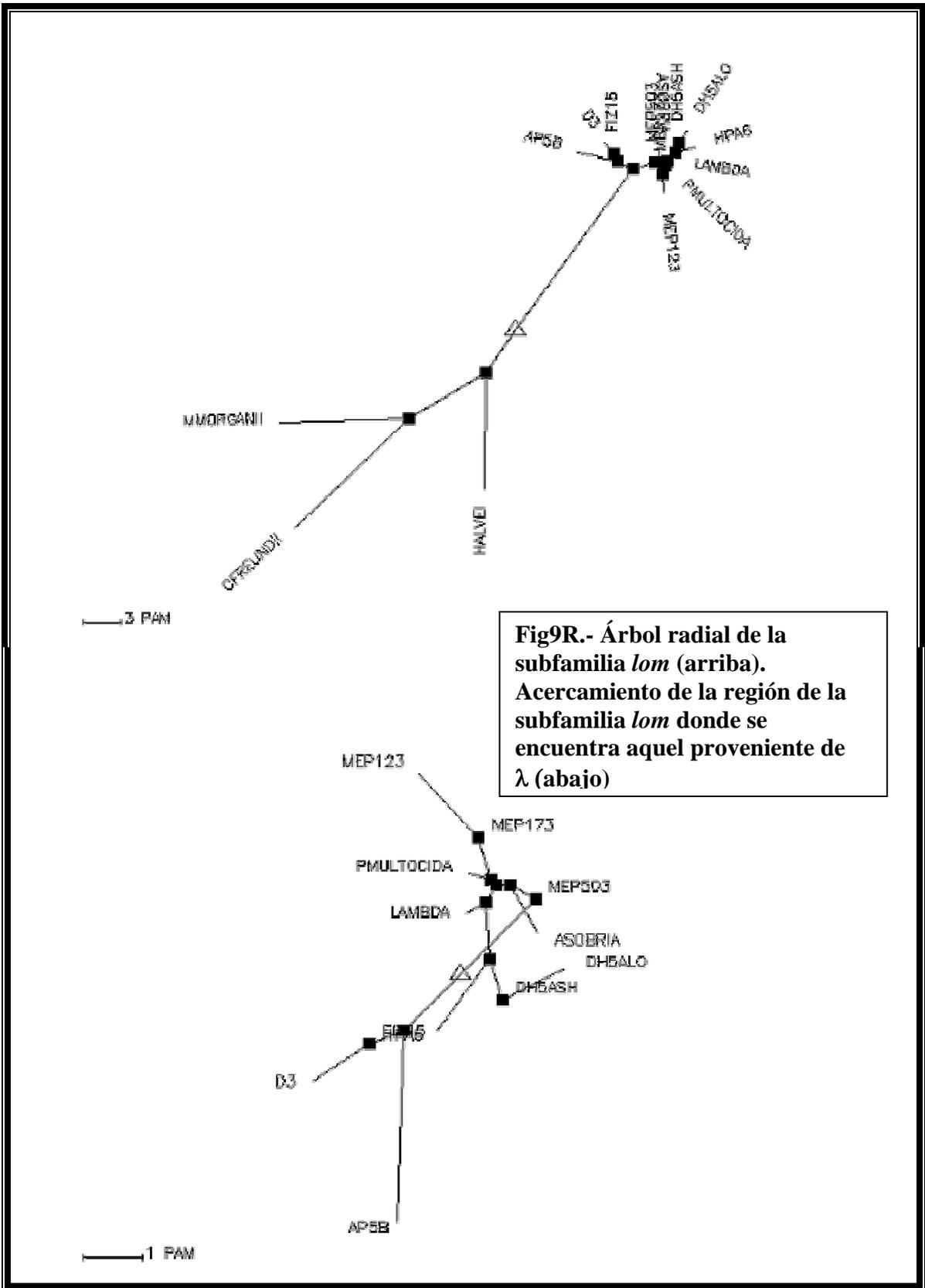


Fig.6R.- Alineamiento de la subfamilia *Iom*. Las regiones de color rojo indican alto índice de homología en los distintos clusters o agrupamientos (>90%), las regiones en azul indican índice de homología medio (>50%) y las regiones en color negro bajo índice de homología (>1%). Las líneas punteadas indican gaps en el cluster.







Secuencias regulatorias del gen *lom* del bacteriófago λ

A fin de determinar los probables mecanismos de regulación de la expresión del gen *lom* de λ , decidimos analizar *in silico* las secuencias circundantes a éste, tanto dentro como fuera de la región *b* de λ . Mediante el análisis MatInspector V2.2 (Quandt, K et al, 1995) Se localizaron secuencias regulatorias en la región intergénica *J-lom*; por otro lado, en la misma región intergénica y la región 3' de J fue determinada una probable estructura de terminación de la transcripción (Fig. 10R) mediante análisis RSSP (RNA Secondary Structure prediction Software; Brodsky, L.I. 1992).

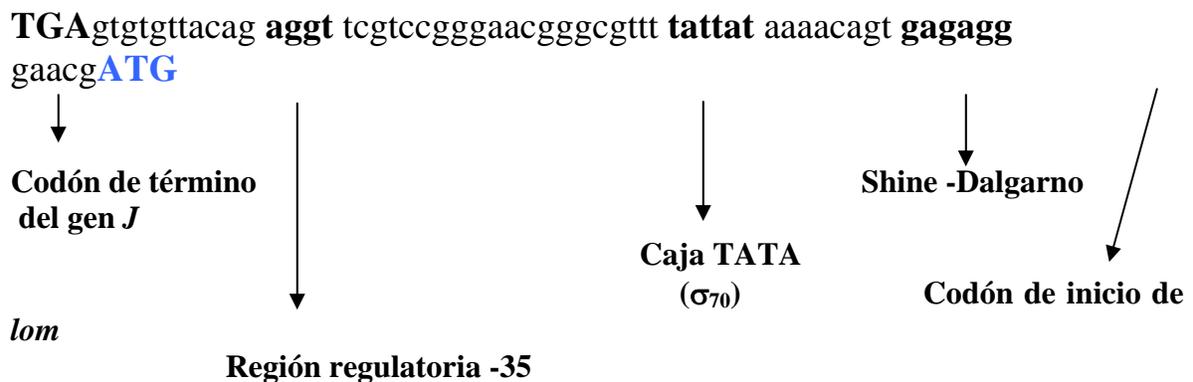


Fig. 11R.- Región intergénica *J-lom* y probables secuencias regulatorias de la transcripción.

Regiones conservadas de la proteína Lom

El análisis CDART (Conserved Domain Architecture) y CDS (Conserved Domain sequence) (Marchler-Bauer A, et al 2003) mostró la presencia de secuencias consenso y arquitectura de dominios altamente conservados con otros relacionados a proteínas asociadas a opacidad (Opa) (Fig. 12 R). El mismo patrón de asociación a Opa resultó de la traducción *in silico* de las 14 secuencias *lom-like* (dato no mostrado).



PSSM's producing significant alignments:	Score (bits)	E value
gnl CDD 12960 COG3637, COG3637, Opacity protein and related surface antigens... Conserved domain length = 199 residues, 100.0% aligned	75.0	6e-15

Score = 75.0 bits (184), Expect = 6e-15

Fig. 12R.- Análisis *in silico* de secuencias conservadas y arquitectura de dominios en la proteína λ Lom. La recta numérica en negro representa la secuencia de la proteína Lom, alineado a COG3637 en rojo la cual representa las secuencias consenso para distintas proteínas asociadas a opacidad.

Discusión:

El papel del gen *lom* en la adhesión de *E.coli* K12 a CBH.

Como se puede observar en la tabla 1R, el fago λ incrementa la adhesión de su lisógena a CBH en un orden de aproximadamente 10 bacterias por célula (Tabla 1R filas 2-5), siendo nuestra hipótesis que dicho incremento se debe al producto del gen *lom* del bacteriófago λ . Cabe mencionar la presencia del profago críptico RAC en el minuto 30.76” del genoma de *E.coli* K12 cepa C600. El análisis *in silico* de la secuencia de DNA de dicho profago muestra la presencia de un fragmento homólogo al extremo 5' del gen *lom* en RAC llamado *lomR* (figura inferior), por lo que, de codificarse algún producto a partir de éste, carecería de los dominios que, en proteínas de la misma familia, son los responsables del incremento en la adhesión y / o invasión.

Fragmento *lomR* del profago críptico RAC en el genoma de *E.coli* K12.



LEGEND



Por otro lado, si bien la cepa C600 posee a RAC, la cepa AB1157 no porta profago alguno, y sí muestra un comportamiento fenotípico similar, en cuanto a niveles de adhesión se refiere al de la cepa C600 (Tabla 1R filas 2,5). Es por lo anterior que descartamos participación alguna del profago RAC en la adhesión de *E.coli* K12 mediada o no por λ .

Los valores totales de adhesión tanto de la bacteria no lisógena como de aquella lisógena para $\lambda+$ se mantienen similares cuando los ensayos se realizan a 37°C o a 30°C (Tabla 1R filas 4,5) por lo que se deduce que esta variación de temperatura no causa efecto alguno sobre la adhesión, y que el decaimiento en la adhesión de la cepa lisógena para λ *plac cI857* se debe en primera instancia a la sustitución de la región *b* del cromosoma fágico por el gen *lacZ* de *E.coli* (Tabla 1R fila 6). Aunque en este punto puede asegurarse que la región *b* de λ está implicada en el incremento en la adhesión de *E. coli* a CBH, no puede determinarse el papel de *lom* en este fenotipo, ya que si bien la sustitución de la región *b* por el gen *lacZ* abarca la mayor parte del extremo 3' de *lom*, también se encuentran ausentes por sustitución 4 posibles marcos de lectura localizados río abajo de *lom*. En el caso de la cepa AB1157(λ 16-25 *lom::TnphoA bor+*) se observa que los niveles de adhesión se abaten a niveles comparables a los de la cepa no lisógena, lo que sugiere fuertemente que el gen *lom* está implicado en el incremento en la adhesión mediada por λ (Tabla 1R filas 4,9). La sustitución 16-25 en λ no media efecto alguno, toda vez que en la cepa AB1157 λ 16-25 *bor+* + *lom+* el nivel de adhesión se mantiene similar al de la cepa lisógena para $\lambda+$ (Tabla 1R filas 5,7). Así mismo, el incremento en la adhesión no se encuentra modificado positiva o negativamente por el producto proteico de *TnphoA*, ya que al localizarse éste transposón insertado en una posición en el genoma de λ distinta a *lom*, no se modifican los valores de

adhesión (Tabla 1R fila 8). Sin embargo, debido a que *TnphoA* es un derivado del transposón Tn5, al cual se ha atribuido la capacidad de ejercer efecto polar en genes subsiguientes a aquel donde se encuentra insertado, no puede afirmarse que el gen *lom* sea el responsable directo o único del incremento en la adhesión mediada por λ , toda vez que cabe la posibilidad de presentarse efecto polar sobre los 4 marcos de lectura río abajo de *lom*. Por lo anterior, decidimos clonar al gen *lom* en un plásmido de expresión a fin de evaluar su efecto en *E. coli* K12 fuera del contexto genético de λ ; para lo cual, medimos adhesión a CBH a la cepa portadora de la construcción pOS*lom*, tal como se describe en la sección de material y métodos. Los resultados muestran un incremento en la adhesión mediado por el gen *lom* clonado en comparación a la cepa portadora del plásmido sin inserto y a su contraparte isogénica libre de plásmido (Tabla 1R filas 10-12), lo que permite concluir que el gen *lom* del bacteriófago λ es el único responsable del incremento en la adhesión de *E. coli* K12 a CBH.

Existe un dato interesante respecto a los niveles de adhesión observados para la cepa portadora de la construcción pOS*lom* en relación a la inducción de la expresión del inserto *lom*, el lector debe notar que tanto al inducir con 0.1 mM como a 1mM de IPTG, los niveles de adhesión para *E. coli* JM103 (pOS*lom*) se mantienen no solo iguales entre sí (razón por la que se optó por mostrar en la tabla 1R filas 10-12, el promedio de los valores arrojados para ambas concentraciones de IPTG), sino también similares respecto a los de *E. coli* (λ). Tomando en cuenta el coeficiente de afinidad del IPTG por el represor LacI y la relación equimolar entre ambas establecida en una reacción de inducción, se ha reportado que agregando IPTG a una concentración final de 1mM, se induce el secuestro del represor LacI al 100%, y la consecuente expresión de la secuencia que se encontrase bajo la orden

del promotor *lac*, en este caso el gen *lom* (Lewin, B. 2000) ; por lo que en teoría, puede asumirse que agregando 0.1 mM IPTG, deberá decaer en 90% la expresión de *lom*. Sin embargo, el fenotipo observado para *lom* clonado no decae respecto al nivel de inducción proporcionado; a partir de esta observación puede suponerse la existencia de sitios únicos de anclaje para Lom en la membrana de la bacteria, o bien una saturación de los putativos receptores en la célula eucarionte, lo que determina la estabilización en los niveles de adhesión, así mismo, el número bajo de proteína Lom disponibles en la bacteria resultaría suficiente para la activación de los procesos patogénicos conferidos por ésta, lo que habla de la eficiencia del mecanismo de acción de Lom.

Mecanismo de adhesión de la proteína Lom.

Si bien queda confirmado que el gen *lom* por sí mismo incrementa la adhesión de *E. coli* a CBH, no queda claro hasta este punto el mecanismo de acción de la proteína Lom. Se pueden desprender varias hipótesis acerca de esto extrapolando los mecanismos más usuales de adhesión reportados para *E. coli* K12. La primera de ellas es que la proteína Lom fuese una adhesina tipo Pili K99 (la adhesina primaria más común en *E. coli*); sin embargo, esta afirmación pierde fuerza debido a la divergencia significativa a nivel de secuencia aminoacídica y de DNA que se observa entre ambas (dato no mostrado), aunque esto no descartaría que *lom* pudiese compartir mecanismos de acción o regulación similares a los de pili tipo K99.

Una segunda hipótesis es que la participación de Lom en el incremento en la adhesión sea por procesos de tipo catalítico más que por el resultado de interacciones electrostáticas de Lom con un receptor en la célula eucarionte. Como proceso catalítico nos referimos a la exposición de otras estructuras adherentes en la membrana bacteriana que permitieran un incremento en la adhesión, esta sobreexposición podría estar dada por la inclusión de Lom

en la membrana externa de *E. coli* y el consecuente rearrreglo de ésta, o bien, por un rearrreglo del citoesqueleto bacteriano por efecto de Lom que permitiese potenciar el efecto de otros procesos adhesivos o invasivos.

Una tercera hipótesis postularía que el carácter adherente de Lom fuese un estado transitorio de un fenotipo de naturaleza más global, probablemente un proceso de internalización celular como aquel favorecido en *Y. enterocolitica* por la proteína Ail (Heffernan et al 1992).

Los ensayos realizados a 18°C excluyen el efecto adherente mediado por pili tipo K99, ya que se ha reportado que a esta temperatura la síntesis y el ensamblaje de las subunidades de éstos se abate (Isaacson, R. 1982). Como se puede observar en la tabla 1R filas 1-5, el efecto de *lom* prevalece a 18°C, mientras que aquel mediado por pili tipo K99 se abate, lo que indica que Lom no es un pili tipo K99 o no comparte mecanismos regulatorios con éste. Sin embargo, Isaacson reportó en 1983 la presencia de subunidades formadoras de pili no ensambladas en la bacteria a 18°C, dando esto lugar a la suposición, débil pero razonable, de que Lom funcionase ensamblando éstas unidades; sin embargo, esto queda descartado al analizar los valores de adhesión mostrados por la cepa HB101(pOS*lom*); donde el efecto de adhesión observado no corresponde a la formación de pilus sino al efecto adherente conferido por Lom, toda vez que la cepa HB101 es incapaz de sintetizar subunidades formadoras de pili, por lo que se concluye que el producto del gen *lom* no es una adhesina tipo pili K99.

Internalización bacteriana mediada por *lom*.

Como ya se ha mencionado, el gen *lom* es considerado el ancestro de una familia de 5 genes relacionados con virulencia, entre ellos el gen *ail* de *Y. enterocolitica*, el cual está relacionado con adhesión e invasión (Heffernan et al 1992); por lo que medimos esta última

propiedad de virulencia a la cepa portadora del gen *lom* clonado, utilizando un método nuevo desarrollado en nuestro laboratorio basado en la utilización del gen reportero *gfp*.

Si bien existen diversos métodos para evaluar la capacidad invasiva de *E. coli*, la mayoría de éstos son llevados a cabo utilizando células en cultivo, las cuales presentan diferencias con las células utilizadas *in vivo* en cuanto a receptores y otros componentes celulares, éstas diferencias pueden impedir la observación de algunos procesos patogénicos bacterianos. Otros ensayos realizados *in vivo*, aunque más certeros, resultan largos y laboriosos. Nuestro ensayo permite la rápida evaluación de múltiples muestras utilizando bacterias que expresan la proteína verde fluorescente (GFPuv); sumando a esto la ventaja que supone la utilización de células bucoepiteliales obtenidas frescas, permitiendo así una aproximación más exacta a las condiciones propias de la bacteria en un sistema biológico abierto. Otra ventaja más que supone nuestro ensayo, es la eliminación total del fondo contaminante durante el conteo de bacterias invasivas, ya que a 260 nm (pico máximo de excitación por radiación UV para la GFPuv) no pueden observarse, mediante microscopia de fluorescencia, bacilos indígenas (Tabla 2R fila 1).

El análisis de los datos mostrados en la tabla 2R permite concluir que la invasión de *E.coli* K12 Top10 se incrementa en presencia del gen *lom*, toda vez que *E.coli* K12/Top10(λ +)/pGFPuv, fue capaz de invadir en el orden de 10 bacterias por célula (tabla 2R fila 3), mientras que *E. coli* K12 Top10/pGFPuv (λ plac *cI857*) mostró un decaimiento en la invasión a CBH de aproximadamente 60%, equiparable a los niveles invasivos observados para la cepa no lisógena (tabla 2R filas 2,5).

Evolución molecular del gen *lom* vs. patogénesis.

Los resultados mostrados en las figuras 3R, 4R y 5R muestran productos de amplificación únicos para cada cepa analizada en el rango de 621 a 759 pb (excepto en la cepa *E. coli* DH5 α , en la cual se obtuvieron dos productos de amplificación, uno de ellos compuesto por 1245pb). Lo anterior sugiere un alto grado de conservación y especificidad en los extremos 5' y 3' de las secuencias *lom*-like en los genomas analizados, esto a pesar de compartir secuencias codificantes consenso de integración a membrana externa con otros genes. Dicha especificidad en el extremo 3', concuerda con lo reportado por Barondess y Beckwith en 1995, respecto a la localización de proteínas Lom en la membrana externa de cepas clínicas de *E. coli* lisógenas para fagos lambdaoides, utilizando para esto un anticuerpo de reconocimiento específico para los últimos 6 aminoácidos de Lom.

Por razones que serán aparentes más adelante, se propone el cambio de nomenclatura del gen *lom* a gen *cig*, y utilizaremos indistintamente ambas nomenclaturas de acuerdo al contexto que se maneje.

El alineamiento entrecruzado independiente de las secuencias obtenidas, muestra un alto índice de homología entre ellas (Tabla 3R), resultando *cigC*-like (*C. freundii*) el miembro más distante del grupo, seguido de *cigHa*-like (*H. alvei*) y *cigM* (*M. morgani*). Estas 3 secuencias provienen de cepas aisladas del tracto digestivo de *C. humboldtianum*, por lo que la adhesión de éstos microorganismos al epitelio entérico resulta relevante, y por ende, todas aquellas moléculas que promuevan su adherencia deberán ser consideradas de gran importancia selectiva.

La secuencia *cigDL*-like (*E.coli* DH5 α 10) muestra ser la más alejada filogenéticamente del subgrupo conformado por *cigH*-like, *cigC*-like y *cigM*. Ambas secuencias presentes en

E.coli DH5 α (*cigDL*-like y *cigDS*-like) poseen homología con otra encontrada mediante el análisis *in silico* del profago críptico RAC del minuto 30.76” del genoma de *E.coli* K12, la cual se encuentra interrumpida por secuencias *IS5* relativas a *Tn5*, así mismo, río arriba de este gen *lom* defectivo, se encuentra un fragmento incompleto homólogo al gen *J* de λ y río abajo de la secuencia *lom* defectiva se localiza un fragmento homólogo al gen *gp37* y, posterior a éste, se ubica una secuencia homóloga al *orf206* localizado a la derecha inmediata de *lom* en el genoma de λ en la región *b*. Estas observaciones son similares a las reportadas por Casjens, S. en el 2003 respecto a la composición genotípica del profago RAC, lo que nos sugiere la que la región *b* y secuencias contiguas en λ , pudiesen funcionar como “manchas calientes” de recambio de secuencias, permitiendo así la transferencia genética horizontal y / o vertical. No es gratuito que el gen *lom* esté localizado en esta “mancha caliente” de recambio, ya que las mutaciones en esta región de λ no afectan los procesos de multiplicación del fago, lo que permite una mayor “elasticidad” en cuanto a pérdida y / o ganancia de secuencias.

El resto de las secuencias mostradas en la tabla 3R muestra un índice de homología entre 96 y 100%, así como índices de gaps menores al 1% (<10 gap’s por secuencia), lo que obviamente nos refiere a la gran conservación de las secuencias *lom* y *lom*-like, si sumamos a esto la gran distribución que ya hemos referido, hablamos entonces de una secuencia que, merced a los fenotipos que confiere, resulta muy ventajosa para la bacteria portadora.

El alineamiento grupal de las secuencias *lom* y *lom*-like mostrado en la figura 6R, muestra que la similitud entre éstas es alta y a lo largo de toda la secuencia, incluso en la secuencia larga aislada a partir de DH5 α (DH5 α lo) se presenta una pequeña región de homología en el extremo 5’, seguido de un extenso gap previo a la región compartida con las demás

secuencias, lo que indica que aun siendo interrumpida ésta secuencia mantiene intacto el marco de lectura correspondiente. El análisis filogenético desarrollado a partir de este alineamiento grupal confirma lo antes mencionado relativo a que las secuencias *cigH*-like, *cigC*-like y *cigM*-like conforman el grupo filogenéticamente más alejado del resto de la subfamilia *lom* (Fig. 7R, 9R); sin embargo, este alejamiento no se debe a mutaciones puntuales o deleciones extensas, sino a un intercambio de posición de “clusters”. Heffernan y cols en 1992, propusieron a *lom* como el ancestro de la familia OMP, basándose en las distancias relativas observadas entre ellos a nivel de secuencia aminoacídica, sin embargo; de acuerdo a la comparación filogenética de la familia OMP y la subfamilia *lom* presentada aquí (Fig. 8), podemos concluir que no es el gen *lom* de λ , sino su similar aislado a partir de *C. freundii* la secuencia que puede considerarse como ancestro de la familia OMP, ya que es la más alejada en cuanto a concordancia de secuencia nucleotídica, presencia de gap's y ordenamiento de clusters se refiere. En contraste, la secuencia DH5Lo es la más cercana al gen *rck*, el cual es el miembro de la familia OMP filogenéticamente más próximo a la subfamilia *lom*, seguido por DH5Sh, Hpa6 y λ *lom*.

Regulación de la expresión de *lom*.

Río arriba del gen *lom* se localizan 4 marcos de lectura abiertos, la traducción *in silico* de éstos en los 24 marcos de lectura posibles no describieron secuencias conservadas de regulación o unión a DNA.

El gen *lom* se localiza a la derecha del gen estructural tardío *J*, con base en esto, se logró determinar una región intergénica que consta de 61 nucleótidos, contando a partir del

nucleótido inmediato siguiente al de término del gen *J*, hasta aquél inmediato anterior al codón de inicio de *lom*.

Analizando respecto al gen *J*, se determinó dentro de ésta región intergénica un probable terminador para éste (Fig. 10R), el cual posee la estructura clásica de tallo y asa, pero con una ΔG positiva, lo que indica poca estabilidad en su estructura secundaria, y por lo tanto, un reducido control sobre la terminación de *J*, pudiendo afectar esto la expresión de *lom* por solapamiento de mRNA, o antiterminación por ruptura espontánea de la estructura del terminador.

Por otro lado; en la misma región intergénica, pero analizando respecto a *lom* se identificaron regiones consenso similares a las reportadas para las secuencias Shine-Dalgarno, TATA y región -35 (Fig. 11R). La secuencia TATA predicha posee afinidad de unión por la subunidad σ_{70} , la cual ha sido descrita como de “economía doméstica” (Lewin B. 2000) , por lo que no requiere una subunidad sigma especial, sumado esto a que no localizamos alguna región operadora en la zona intergénica, lo que sugiere que *lom* se expresa de manera constitutiva.

Acerca de la naturaleza molecular de *lom*.

De acuerdo a los datos mostrados anteriormente, surge una pregunta obligada: ¿el gen *lom* es una adhesina o una invasina ?. Comparando los datos de adhesión con los que reportamos para invasión, se observa que mientras el incremento en la adhesión es de aproximadamente 50%, la invasión es favorecida en el orden de 150%, lo que sugiere que *Lom* puede funcionar como invasina, y que el efecto adherente observado no es sino el resultado de bacterias en proceso de invasión. Sin embargo, más allá del punto de vista

estadístico, es importante notar que en ausencia de pili (tabla 1R filas 1-5, 13-15) se encuentran bacterias adheridas a la superficie celular eucarionte.

Una invasina, en el sentido estricto, involucra un proceso capaz de internalizar a la bacteria una vez que ésta se ha adherido a la superficie celular mediante procesos independientes no necesariamente dirigidos a la posterior internalización, un ejemplo de esto es la adhesión de *S. typhimurium* mediada por pili, la cual es independiente del sistema de secreción tipo III, responsable (entre otros procesos) de la internalización bacteriana (Hueck, C., 1998). En el caso del gen *lom*, éste se basta por si mismo no solo para favorecer la invasión bacteriana, sino también, la adhesión en ausencia de otros ligandos tales como pili K99, por lo que *lom* no puede ser considerado estrictamente una adhesina o una invasina, sino un factor de internalización capaz de realizar ambos eventos de manera independiente.

La búsqueda *in silico* de dominios consenso en la secuencia aminoacídica predicha para Lom (Fig. 12R), muestra la presencia de regiones altamente conservadas, así como una arquitectura de dominios proteicos concordantes con aquellos reportados para la familia de proteínas relacionadas a factores de opacidad (OPA). La importancia de esta observación reside en la naturaleza intrínseca de las proteínas OPA, las cuales han sido ampliamente descritas principalmente para los géneros *Neisseria spp.* (Hauck, C. 2003) y *Streptococci spp.* (Katerov, V. 2000), relacionándoseles a procesos patogénicos tales como adhesión e invasión a epitelios, transducción de señales, entre otros. La naturaleza adhesiva e invasiva de Lom, concuerda con el comportamiento fenotípico reportado para las proteínas Opa de *N. meningitidis* (Hauck, C. 2003), *N. gonorrhoeae* (Popp, A. 1999), *S. aureus* (Foster, T. 1998) y *S. pyogenes* (Katerov, V. 2000). Así mismo, la estructura terciaria para Lom predicha en este trabajo (dato no mostrado), sugiere que ésta presenta un plegamiento tipo β - barrel, exponiendo al exterior de la bacteria 4 loops similares en secuencia y estructura a

aquellos dominios Opa consenso de unión a receptores pertenecientes a la familia CEA (Popp, A. 1999).

Popp y cols. han sugerido la probable existencia de secuencias relacionadas a *opa* en otros géneros; sin embargo, hasta donde sabemos, éste es el primer reporte de un gen *opa* portado por un bacteriófago y más aún, en *E.coli* K12. Se sabe que en proteínas Opa del género *Neisseria spp.* existen dos dominios variables y dos hipervariables a nivel de secuencia, los cuales son espacialmente intercambiables (Popp, A. 1999), lo que puede correlacionarse con la divergencia en cuanto a la posición de “clusters” en la secuencia de DNA de genes homólogos a *lom* aislados a partir de las cepas de campo de *C. freundii*, *M. Morganii* y *H. alvei*.

En el genoma de *E.coli* K12 cepa DH5 α se encuentran 2 secuencias *lom*-Like (tres, si la bacteria es infectada por λ), lo que puede correlacionarse con observaciones realizadas en *N. gonorrhoeae*, en cuyo genoma se han identificado hasta 11 versiones de genes *opa* secuencialmente relacionados pero cuyos productos son antigénicamente distintos (Bhat, K. 1991), Cada uno de éstos alelos son constitutivamente transcritos, pero su traducción es “fase-variable” como resultado de cambios RecA-independientes en el número de unidades repetidas de pentanucleótidos codificantes localizados en la secuencia líder. Esta variación da como resultado la expresión diferencial de variantes Opa antigénicamente distintas, generando una población fenotípicamente heteróloga, la cual presenta al mismo tiempo una, varias, o ninguna proteína Opa, permitiendo así, la diversificación de la población en cuanto a reconocimiento de distintos receptores, y por consecuencia de distintas líneas celulares (Stern et al, 1986). Por lo anterior no resulta extraña la presencia de dos o más

secuencias *lom* en el genoma de *E.coli* K12 *DH5 α* debido a la ventaja selectiva que puede representar su expresión.

Bajo el mismo tenor de variabilidad fenotípica puede explicarse la presencia de genes *lom-like* en las cepas analizadas en este trabajo, ya que la expresión de éste significaría una ventaja selectiva para la bacteria portadora.

El gen *cig*.

En 1979, Reeve y Shaw designaron a *lom* en base a la localización de su producto en la membrana externa de minicélulas; sin embargo, creemos que ésta definición de *lom* no es apropiada tomando como base las observaciones expuestas en este trabajo respecto al fenotipo que confiere, así como a la amplia distribución y alta conservación a nivel de secuencia, proponemos el cambio de nombre a gen *cig*, siglas correspondientes a Conserved Internalization Gene. De la misma manera, las secuencias de DNA reportadas en este trabajo filogenéticamente relacionadas a λ *cig*, se denominarán *cig-like*() seguido de la abreviatura correspondiente al organismo a partir de cuyo genoma fueron aislados. Este cambio en la nomenclatura de *lom* permitirá identificar a esta secuencia de λ de acuerdo al fenotipo que confiere a *E.coli* K12.

Bibliografía:

1. Arscott, J.T. & E.B. Goldberg, 1976. Cooperative action of the T4 tail fibers and base plate in triggering conformational change and in determining host range. *Virology* 69:15-22.
2. Baker, N.R., V. Minor, C. Deal, M.S. Shahrabadi, D.A. Simpson & D.E. Woods, 1991. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesin. *Infect. Immun.* 59:2859-2863.
3. Barksdale, L. & S.B. Arden, 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Ann. Rev. Microbiol.* 28:265-299.
4. Barondess, J.J. & J. Beckwith, 1995. *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* 177:1247-1253.
5. Barondess, J.J. & J. Beckwith. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature* 346: 871-874.
6. Beachey, H.E., 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Rev. Infect. Dis.* 143:325-343.
7. Beutin, L., U.H. Stroecher & P.A. Manning, 1993. Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene* 132:95-99.
8. Bhat K.S., Gibbs C.P., Barrera O., Morrison S.G., Jahnig F., Stern A., Kupsch E.M., Meyer T.F., Swanson J. 1991. The opacity proteins of *Neisseria gonorrhoeae* strain Ms11 are encoded by a family of 11 complete genes, *Mol. Microbiol.* 5 1889-1901.
9. Bishai, W.R. & J.R. Murphy, 1988. Bacteriophage gene products that cause human disease. En: *The Bacteriophages*, Vol. 2. pp. 683-725. Calendar, R. (ed). Plenum Press, New Cork
10. Blattner, et.al. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science* 277: 1453-1462
11. Bliska, J.B. & S. Falkow, 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:3561-3566
12. Bodey, G.P., R. Bolivar, V. Fainstein & L. Jadeja, 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5:279—313.
13. Brodsky L.I., Vasiliev A.V., Kalaidzidis Ya.L., Osipov Yu.S., Tatzov R.L., Feranchuk S.I. GeneBee: the program package for biopolymer structure analysis, 1992, *Dimacs*, 8, 127-139.
14. Casjens S. 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?. *Molecular Microbiology. Microreview.* 49 (2), 277-300
15. Cheetham, B.F. and M.E. Katz, 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 18:201-208.
16. Clark, C.A., J. Beltrame and P.A. Manning, 1991. The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6. *Gene* 107:43-52.
17. Coleman, D., D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbuthnott, B.F. Carey and H.M. Pomeroy, 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen Microbiol.* 135:1679-1697.

18. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16 (22). 10881-10890.
19. Court, D. & A.B. Oppenheim, 1983. Phage lambda's accessory genes. En *Lambda II*. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl & R.A. Weisberg (eds). p. 251, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
20. D'Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus Académie Sciences* 165:373-375.
21. Doig, P., P.A. Sastry, R.S. Hodges, K.K. Lee, W. Paranchych & R.T. Irvin, 1990. Inhibition of pilus-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells by monoclonal antibodies directed against pili. *Infect. Immun.* 58:124-130.
22. Echols, H. & G. Guarneros, 1983. Control of integration and excision. En *Lambda II*. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl & R.A. Weisberg (eds). p. 75-92, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
23. Echols, H. & L. Green, 1971. Establishment and maintenance of repression by phage lambda: the role of cI, cII and cIII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2190-2194.
24. Echols, H., 1972. Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Ann. Rev. Gen.* 6:157-190.
25. Echols, H., 1979. Bacteriophage & Bacteria: Friend and foe. *The Bacteria*, Vol. VII, Chapter 8, p. 487-516.
26. Ellis, E.L. & M. Delbrück, 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22:365-384.
27. Espion, D., K. Kaiser and C. Dambly-Chaudiere, 1983. A third defective lambdaoid prophage of *Escherichia coli* K12 defined by the λ derivative λ_{qin11} . *J. Mol. Biol.* 170:611-633
28. Farinha, M.A., B. J. Allan, E.M. Gertman, S.L. Ronald & A.M. Kropinski, 1994. Cloning of the early promoters of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: Sequence of the immunity region of D3. *J. Bacteriol.* 176:4809-4815.
29. Foster, T., Hook, M. 1998. Surface protein adhesines of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology.* 6 484-488.
30. Franklin, N.C. & G.N. Bennet, 1979. The N protein of bacteriophage lambda, defined by its DNA sequence, is highly basic. *Gene* 8:107-119.
31. Freeman, V.J. 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 61:675-688.
32. Friedman, D.I. & L.S. Baron, 1974. Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage λ . *Virology* 58:141-146.
33. Friedman, D.I., M. Baumann & L.S. Baron, 1976. Cooperative effects of bacterial mutations affecting λ N gene expression I. Isolation and characterization of a nusB mutant. *Virology* 73:119-127.
34. Friedman, D.I., A.T. Schauer, M.R. Baumann, L.S. Baron & S. Adhya, 1981. Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1115-1122.
35. Gaastra, W. & A.M. Svennerholm, 1996. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol.* 4:444-452.
36. Gottesman, M.E., S. Adhya & A. Das, 1980. Transcription antitermination by bacteriophage lambda N gene product. *J. Mol. Biol.* 140:57-75.
37. Grayhack, E.J. & J.W. Roberts, 1982. The phage λ Q gene product: Activity of a

- transcription antiterminator in Vitro. Cell 30:637.
38. Hackett, J., P. Wyk, P. Reeves & V. Mathan. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11 kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. J. Infect. Dis. 155:540-549.
 39. Harp, L.H., 1988. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. En: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Roth, J.A. (ed). pp.3-27. ASM Press, Washington, D.C.
 40. Hata, J.S. & R.B. Fick, 1991. Airway adherence of *Pseudomonas aeruginosa*: mucopolysaccharide binding to human and bovine airway proteins. J. Lab. Clin. Med. 117:410-422.
 41. Hauck, C., Meyer, T.F. 2003. "Small Talk": Opa proteins as mediators of Neisseria-host cell communication. Current Opinión. 6 43-49.
 42. Hayashi, T., H. Matsumoto, M. Ohnishi and Y. Terawaki, 1993. Molecular analysis of a cytotoxin-converting phage, phi CTX, of *Pseudomonas aeruginosa*: structure of the attP-cos-ctx region and integration into the serine tRNA gene. Mol. Microbiol. 7:657-667
 43. Heffernan, E.J., J. Harwood, J. Fierer & D. Guiney, 1992. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene rck is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including pagC and ail. J. Bacteriol. 174:84-91.
 44. Heffernan, E.J., L. Wu. J. Louie, S. Okamoto, J. Fierer & D.G. Guiney, 1994. Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes rck from *Salmonella typhimurium* and ail from *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 62:5183-5186.
 45. Hendrix R.W., 1971. Identification of proteins coded by phage lambda. En The bacteriophage lambda . Hershey, A.D. (ed), p. 355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 46. Hernández, V.J., T.D. Edlin, R.F. Young & G.M. Ihler, 1985. The DNA between Rz and cosR in bacteriophage lambda is nonessential. Gene 33:363-365.
 47. Hershey, A.D. & M. Chase, 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 36:39-56.
 48. Hershey, A.D., E. Burgi & L. Ingraham, 1963. Cohesion of DNA molecules isolated from phage lambda. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49:748-755.
 49. Herskowitz, I. & D. Hagen, 1980. The lysis-lysogeny decision of phage λ : Explicit programming and responsiveness. Ann. Rev. Genet. 14:399-445.
 50. Highton, P.J., Y. Chang, W.R. Macote Jr and C.A. Schnaitman, 1985. Evidence that the outer membrane protein nmpC of *Escherichia coli* K12 lies within the defective qsr' prophage. J. Bacteriol. 162:256-262.
 51. Holloway, B.W. & G.N. Cooper, 1962. Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 84:1321-1324.
 52. Holloway, B.W. & V. Krishnapillai, 1975. Bacteriophages and bacteriocins. En: Clarke, P.H., M.H. Richmond (ed) Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*. Wiley, London, pp. 99-132.
 53. Holmes, R.K. and W.L. Barksdale, 1969. Genetic analysis of tox⁺ and tox⁻ bacteriophages of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Virol. 3:586-598.
 54. Hueck, C. 1998. Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (2) 379-433

55. Irvin, R.T., P. Doig & K.K. Lee, 1989. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* pilus adhesins: confirmation that the pilin gene structural protein subunit contains a human epithelial cell-binding domain. *Infect. Immun.* 57:3720-3726.
56. Isaacson, R. 1983. Regulation of Expression of *Escherichia coli* pilus K99. *Infection and Immunity.* 40 (2) 633-639.
57. Jonge, M., Vidarsson, G., Van Dijken, H., Hoogerhout, P., Van Alphen, L., Dankert, Van der Ley, P. 2003. Functional activity of antibodies against the recombinant OpaJ protein from *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity.* 71 (5) 2331-2340
58. Kaiser, K. And N.E. Murray, 1979. Physical characterization of the "Rac prophage" in *E. coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 175:159-174.
59. Katerov, V., Lindgren, P.E., Totolian, A., Schalén, C. 2000. *Streptococcal* Opacity Factor: A family of bifunctional proteins with lipoproteinase and fibronectin-binding activities. *Current Microbiology.* 40 149-156.
60. Kravchenko, V.V., Vasilenko, S.K. & Grachev, M.A. 1979. A rightward promoter to the left of the att site of lambda phage DNA: possible participant in site-specific recombination. *Gene* 7:3-4.
61. Kupsch, E.M., Knepper, B., Kuroki, T., Heuer, I., and Meyer, T.F. 1993. Variable opacity (opa) outer membrane proteins account for the cell tropism displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J.* 12: 641-650.
62. Kur, J., N. Hasan & W. Szybalsky. 1989. Repression of transcription from the b2-att region of coliphage lambda by integration host factor. *Virology* 168:236-244.
63. Kuzio, J. & A.M. Kropinski, 1983. O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3. *J. Bacteriol.* 155:203-212.
64. Little, J.W & D.W. Mount, 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29:11-22.
65. Lu, K.C & K.K. Mark, 1980. The phage promoter responsible for the expression of the inserted beta-galactosidase gene in bacteriophage lambda *plac5*. *Molec. Gen. Genet.* 178:555-560.
66. Luria, S.E., J.E. Darnell, D. Batimore & A. Campbell, 1978. *General Virology*, 3rd Ed. Wiley, N.Y. p. 144.
67. Manoil, C. & J. Beckwith, 1985. Tnp ϕ A: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:81-29-8133.
68. Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH. 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 31:383-387
69. Miller, H.I. & H. A. Nash, 1981. Direct role of the himA gene product in phage λ integration. *Nature* 290:523-526.
70. Miller, J.H. 1980. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. p.138
71. Miller, S.I., A.M. Kukral & J. Mekalanos, 1989. A two component regulatory system (phoP/phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5054-5058.
72. Miller, V.L. & S. Falkow, 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56:1242-1248.
73. Miller, V.L., J.B. Bliska & S. Falkow, 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia*

- enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. J. Bacteriol. 172:1062-1069.
74. Moody, M.F., 1973. Sheath of bacteriophage T4. III. J. Mol. Biol. 80:613-636.
 75. Neidhart, F. C. 1999. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. ASM. CD-Rom Edition.
 76. Newland, J.K., N.A. Strockbine, S.F. Miller, A.D. O'Brien and R.K. Holmes, 1985. Cloning of shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. Science 230:258-264.
 77. Nida, S.K. and J.J. Ferretti, 1982. Phage influence on the synthesis of extracellular toxins in group A *Streptococci*. Infect. Immun. 36:745-750.
 78. O'Brien, S.J. (ed), 1984. Genetic Maps. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 79. Pujol, C., Eugene, E., Morand, P., Nassif, X. 2000. Do pathogenic *Neisseria* need several ways to modify the host cell cytoskeleton?. Microbes and Infection. 2 821-827.
 80. Pulkkinen, W.S. & S.I. Miller, 1991. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. J. Bacteriol. 173:86-93.
 81. Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. 1995. MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Research 23 4878-4884
 82. Ramphal, R., C. Sadoff, M. Pyle & J.D. Silipigni, 1984. The role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. Infect. Immun. 44:38-40.
 83. Reeve, J.N. & J.E. Shaw, 1979. Lambda encodes an outer membrane protein: The *lom* gene. Molec. Gen. Genet. 172:243-248.
 84. Reid, G., H.G.L. Brooks and D.F. Bacon, 1983. In Vitro attachment of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells: Variation in receptivity during the menstrual cycle and pregnancy. J. Infect. Dis. 148:412-421.
 85. Roberts, J.W. 1969 Termination factor for RNA synthesis. Nature 224:1168-1174.
 86. Rosenberg, M., D. Court, H. Shimatake, C. Brady & D.L. Wulff, 1978. The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage λ . Nature 272:414-423.
 87. Rosenvold, E.C., E. Calva, R.R. Burgess & W. Szybalski. 1980. In Vitro transcription from the b2 region of bacteriophage λ . Virology 107:476-487.
 88. Russel, M., 1991. Filamentous phage assembly. Mol. Microbiol. 5:1607-1613.
 89. Saiman, L.K., K. Ishimoto, S. Lory & A. Prince, 1990. The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers. J. Infect. Dis. 161:541-548.
 90. Salstrom, J.S. & W. Szybalski, 1978. Coliphage λ nutL: A unique class of mutants defective in the site of N product utilization for antitermination of leftward transcription. J. Mol. Biol. 124:195-222.
 91. Sato, H. & K. Okinago, 1987. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse epidermal cells. Infect. Immun. 55:1774-1778.
 92. Schlesinger, M., 1934. Zur Frage der chemischen Zusammensetzung des Bakteriophagen. Biochemische Zeitschrift 273:306.
 93. Sexton, M. & D.J. Reen, 1992. Characterization of antibody-mediated inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to epithelial cells. Infect. Immun. 60:3332-3338.

94. Stoorvogel, J., M. Van Bussel, J. Tommassen & J. Van de Klundert, 1991. Molecular characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). *J. Bacteriol.* 173:156-160.
95. Strom, M.S. & S. Lory, 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Anu. Rev. Microbiol.* 47:565-596.
96. Szybalski, E. & W. Zzybalski, 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7: 217.
97. Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250
98. Twort, F.W., 1915. An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses. *Lancet* 189:1241-1243.
99. Vaca, P.S., O. García and G.L. Paniagua, 1997. The *lom* gene of bacteriophage λ is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:129-132.
100. Vaca, S. & C. Cervantes, 1988. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 30:87-90
101. Vaca, S. , J. Arce, G. Oliver, D. Arenas & F. Argüello, 1989. FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 31:1-5.
102. Vollenweider, H.J. & W. Szybalski, 1978. Electron microscopic mapping of RNA polimerasa binding to coliphage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 123:485.
103. Woods, D.E., D.C. Straus, W.G. Johanson Jr., V.K. Berry & J. A. Bass. 1980. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 29:1146-1151
104. Young, E.T. & R.L. Sinsheimer, 1964 Novel intra-cellular form of lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 10:562-564.