

156
Rej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO DE LOS GENES
phoE Y gltB DE Salmonella typhi"

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a:

JOSE LUIS PUENTE GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
-MEMBRANA EXTERNA.....	1
-LIPOPOTEINA.....	5
-PROTEINA Omp A.....	5
-PORINAS.....	6
-PROTEINA Pho E.....	8
-ENZIMA GLUTAMATO SINTASA (GOGAT).....	15
-CONSTRUCCION DE UN BANCO DE GENES.....	19
-COLIFAGO LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACION.....	19
-BACTERIOFAGO LAMBDA.....	20
-FAGO LAMBDA 1059.....	21
II.- OBJETIVOS.....	25
III.- MATERIALES Y METODOS.....	26
IV.- RESULTADOS.....	32
-AISLAMIENTO DEL FAGO LAMBDA PBC217 (GOGAT).....	32
-AISLAMIENTO DEL FAGO LAMBDA LPC1 (phoE).....	52
V.- CONCLUSION Y DISCUSION.....	73
VI.- BIBLIOGRAFIA.....	79

INTRODUCCION

LA MEMBRANA EXTERNA

La envoltura celular de las bacterias gram-negativas consiste, a diferencia de las bacterias gram-positivas, de dos membranas: la membrana interna (periplásmica ó citoplásmica) y la membrana externa (M.E.). Estas están separadas por una pared de peptidoglicano de aproximadamente 2.5nm que forma una estructura relativamente abierta, la cual es en parte responsable de la rigidez y forma celular, y por un compartimento celular denominado periplasma (fig.1). Este contiene polipéptidos y azúcares con carga neta negativa, y ciertas enzimas, algunas de las cuales funcionan como transportadores o enzimas procesadoras para la conversión a sustratos transportables, de metabolitos que no lo son. La membrana interna es generalmente una bicapa fosfolípidica, la cual contiene una gran variedad de polipeptidos; sus principales funciones son: la generación de energía, el transporte activo y facilitado de nutrientes y la exclusión de productos tóxicos del interior; así como la síntesis enzimática y translocación de componentes de la envoltura celular (25,29).

La M.E. constituye una barrera física y funcional entre la célula y el medio que la rodea, la cual debe discriminar entre los nutrientes y compuestos tóxicos, y mediar selectiva y simultáneamente su exclusión o su incorporación. La M.E. tiene las características fundamentales de una membrana biológica, la cual consiste de una bicapa de moléculas anfipáticas y proteínas, las cuales en forma poco usual son muy abundantes, ya que cubren la cara interna y externa de esta membrana en un 50%(90).

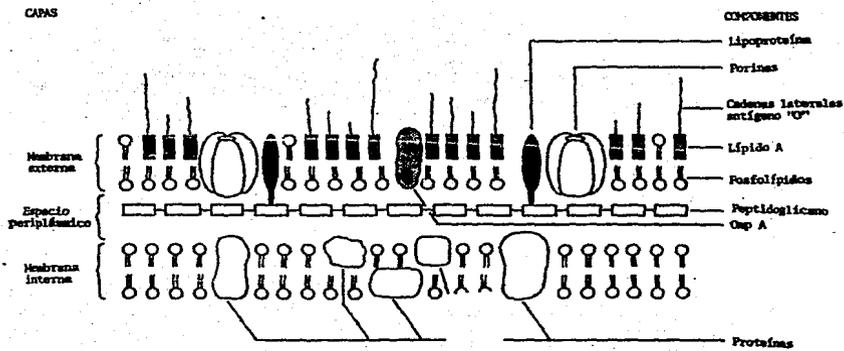


FIG.1.- Esquema de la envoltura celular de una bacteria gram-negativa. En él se señalan los componentes principales.

Por otro lado, la M.E. juega un papel fundamental en las interacciones mediadas por receptores con otras células, bacteriófagos y macromoléculas. Sus componentes son utilizados como receptores por bacteriófagos y colicinas, además están implicados en la conjugación entre bacterias, en el mecanismo de adhesión de la bacteria al organismo huésped (47) y en actividades hemolíticas (15).

En este contexto, la genética ha contribuido en gran medida al entendimiento de la arquitectura y función de la M.E., valiéndose sobre todo de la presencia de estos receptores, los cuales han permitido diseñar métodos sencillos para la selección directa de mutantes específicas de M.E. Estas mutantes han permitido estudiar la regulación y la función de sus constituyentes, así como la purificación de algunos de ellos. (67).

El alto contenido proteico de la M.E. está representado sólo por unas cuantas especies de proteínas, dentro de las cuales se encuentran las conocidas como proteínas principales, que son las más abundantes en toda la célula. Además de estas proteínas, la M.E. está constituida por un lipopolisacárido (LPS) y proteínas menores, las cuales no son tan abundantes. Las proteínas de M.E. (PME) más ampliamente estudiadas, han sido las de Escherichia coli y las de Salmonella typhimurium (30,93).

El LPS es un componente único de la M.E. y está localizado en la parte expuesta de esta membrana. Es una molécula anfifílica que con tiene una región hidrofóbica la cual determina gran parte de la fase lipídica del lado interno de la membrana. Es de gran importancia en la interacción huésped-parásito; además se asume contribuye en las funciones de barrera permeable de esta membrana y de esta manera ser responsable de la resistencia que poseen varias bacterias gramnegati

vas a una serie de antibióticos, debido a que restringe la entrada de moléculas hidrofóbicas. (61,90). El LPS usualmente consiste de tres partes: el lípido A, el oligosacarido central y el antígeno O. El lípido A es la región que conserva el principio endotóxico del LPS; consiste en un dímero de glucosamina substituído con ácidos grasos, principalmente el ácido beta-hidroximirístico. El oligosacarido central está unido covalentemente al lípido A, contiene fundamentalmente azúcares, de los cuales una heptosa y el ácido cetodeoxioctanato (KDO) son prácticamente específicos del LPS. El antígeno O se compone de un número variable de unidades repetidas de 3 a 6 residuos de azúcares; esta gran diversidad determina los diferentes serotipos existentes en una misma especie.

Una de las características más importantes del LPS es que se encuentra anclado en la membrana, mediante la unión a PHE, posiblemente a través de interacciones hidrofóbicas con el lípido A. (130). El LPS confiere a las bacterias gram-negativas de importantes propiedades como la resistencia a antibióticos hidrofóbicos, sales biliares, detergentes, proteasas, lipasas y lisozima. (68,90).

Cerca de 10 a 20 proteínas menores están presentes en la M.E. Muchas de ellas se han identificado como receptores de fagos y colicinas, y se sabe juegan papeles vitales para el crecimiento de la célula, como la incorporación de nutrientes, el transporte de fierro, la incorporación de vitamina B12 o el transporte de nucleósidos. (30,47).

Las proteínas mayores pueden estar expresadas en más de 100,000 copias por célula, y se han descrito alrededor de 10, aunque por lo general sólo se expresan 5 de ellas en una bacteria. Entre las proteínas mayores se encuentran: 1) lipoproteína de Brown (LPP); 2)

proteína modificable por el calor (OmpA) y; 3) proteínas matrices o porinas.

1) La LPP es una de las proteínas principales de la M.E. en E.coli. Está presente en aproximadamente 7.2×10^8 moléculas por célula, es por tanto la proteína numéricamente más abundante en E.coli. La tercera parte de las moléculas de LPP se encuentran unidas covalentemente a la peptidoglicana y estudios del fenotipo de diferentes mutantes parecen indicar que contribuye al mantenimiento de la integridad estructural de la cubierta celular (47). La otra parte de las moléculas de LPP se encuentra en forma libre y ninguna de las dos formas parecen atravesar la M.E., por lo que no actúa como receptora de fagos ni colicinas. La LPP consta de 58 residuos aminoácidos (13) y el gene que la codifica ya ha sido clonado y caracterizado. (86).

2) La proteína Omp A es uno de los polipéptidos más abundantes de la M.E. de E.coli (47). Es un polipéptido de 35,000d (19) que atraviesa la membrana (32) y posee varias funciones biológicas, como la estabilización de los agregados formados durante la conjugación F-dependiente (124) y; junto con la LPP (14), mantiene la integridad estructural de la M.E. (104). Sus funciones no fisiológicas incluyen su participación en la incorporación de una colicina (17) y su habilidad para servir como receptor de los bacteriófagos K3 y Tull (28,124).

El gene ompA de E.coli ha sido aislado (51) y caracterizado (4,23,84); así como el de otras bacterias gramnegativas (24,37).

3) La H.E. de E.coli y de otras enterobacterias, como S.typhimurium contienen cierta variedad de polipeptidos, los cuales han sido denominados porinas. Estas están entre las proteínas más abundantes de la H.E. de las bacterias gramnegativas. Su función principal es la de formar poros de difusión pasiva que permitan el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de esta membrana (66,85). La naturaleza transmembranal de las porinas queda demostrada por su habilidad para servir como receptores de fagos y colicinas y por su firme asociación no covalente a la peptidoglicana (66,70), lo que a su vez las hace importantes para el mantenimiento de la estructura de la superficie celular (92). Las porinas de E.coli, cuyas funciones han sido bastante estudiadas son Omp C y Omp F (8,89), la proteína K (108,127), las porinas inducibles Lam B (110) y Pho E (6,89), y la proteína Nmp C que es producida en grandes niveles por una mutante pseudorevertante de E.coli K12 deficiente de porinas (54,100). Los equivalentes de algunas de estas proteínas han sido caracterizados también en S.typhimurium, donde también existe una Omp D (63,98,111).

Los genes de las proteínas Omp C (79,80), Omp F (55,120) y Pho E (95,114) de E.coli, ya han sido aislados y secuenciados. El análisis de estos datos muestra la existencia de una gran homología a nivel de secuencia nucleotídica y de aminoácidos entre estas proteínas (79,120), sugiriendo así un probable ancestro común. Considerando lo anterior, y a pesar de que los genes no están continuos en el genoma de E.coli (minuto 6, 21 y 47 para phoE (85,113), ompF y ompC (85), respectivamente), las porinas comparten algunas características comunes: a) tienen una composición de aminoácidos y un peso molecular similar, el cual fluctúa entre 35,000 y 45,000 daltones; b) cruzan inmunológicamente; c) la unidad funcional formadora de los poros es un trímero; d) los mono-

meros tienen puntos isoeléctricos menores a 7; e) están presentes en más de 100,000 copias por célula bajo las condiciones adecuadas y; f) todos forman poros transmembranales hidrofílicos con un tamaño similar (85).

A pesar de la similitud estructural y funcional entre Omp F y Omp C, la expresión de los genes correspondientes a estas proteínas, se ve afectada de manera recíproca por la osmolaridad del medio de crecimiento (58,125). Conforme la osmolaridad se incrementa, el gene ompC se expresa más abundantemente, mientras tanto la expresión de ompF se ve reprimida, efecto que se invierte cuando la osmolaridad disminuye. La regulación de la expresión de estos genes está mediada a nivel transcripcional por los genes ompR y envZ (48,125), los cuales forman el operón ompB localizado en el minuto 74 del cromosoma de E.coli (81); este operón ha sido clonado y la secuencia nucleotídica completa ha sido determinada (82,129). La proteína Omp R actúa, al parecer, como un regulador positivo para la expresión tanto de ompF como de ompC, uniéndose a una región del DNA que precede a sus promotores (27,56). El papel de envZ no está claro aún. Recientemente, se ha propuesto que un gene denominado micF interviene en la regulación de ompF a nivel traduccional, mediante la hibridización del transcrito con el mRNA de ompF (83). Sin embargo, se ha observado que una sola copia de este gene no afecta de manera importante la expresión de ompF (78). Con base en estudios realizados sobre mutantes de ompR se ha señalado que la proteína Omp R, puede tomar dos estructuras opcionales dependiendo de la osmolaridad del medio, cada una de las cuales regula positivamente la síntesis, ya sea de Omp F u Omp C (46). Esta estructura alternativa de la proteína Omp R ha sido corroborada recientemente con el estudio de nuevas mutantes (88), estudio en el cual la secuencia del gene ompR ha sido reportada en forma corregida.

LA PROTEINA Pho E

Las primeras observaciones sobre el transporte transmembranal en E.coli indicaban que las proteínas responsables de este fenómeno eran las porinas Omp F y Omp C. Los estudios posteriores, con mutantes carentes de estas proteínas, llevaron a diferentes grupos de investigación a la identificación de una tercera proteína la cual confería a la célula la posibilidad de crecer normalmente. Estos diferentes grupos identificaron a la nueva proteína bajo diferentes nombres, e(69,126); Ic(40,50); E(36); y NmpAB(101), hasta que Lugtenberg, et al(69) y Lee, et al(64), compararon estas proteínas electroforéticamente después de cortar con bromuro de cianógeno, concluyendo que las cuatro eran la misma proteína.

Las investigaciones sobre las condiciones de crecimiento que resultan en la inducción de esta proteína en una cepa silvestre de E.coli K12, llevaron a la observación de que la síntesis es desreprimida por condiciones de limitación de fosfato (94); condiciones bajo las cuales se inducen a su vez la fosfatasa alcalina y otras proteínas periplasmáticas (112).

Como ya se mencionó, el gene que codifica para la proteína Pho E está localizado en el minuto 5.9 del mapa cromosomal de E.coli (113). Este ha sido clonado (114) y su secuencia de aminoácidos y nucleotídica ya ha sido determinada (95). La expresión del gene clonado muestra que Pho E tiene un peso molecular aparente de 40,000 daltones (114). Sin embargo, el análisis de la secuencia indica que es una proteína formada por 351 aminoácidos, de los cuales, los primeros 21 conforman el péptido señal. La proteína madura formada por 330 aminoácidos (990pb) tiene un peso molecular calculado de 36,782 daltones (95).

Al igual que las porinas Omp F y Omp C, esta proteína forma poros de difusión pasiva a través de los cuales pequeñas moléculas hidrofílicas atraviesan la membrana; sin embargo, ha sido comprobado que a diferencia de las otras porinas, Pho E forma poros con preferencia por solutos cargados negativamente (6,60,96). En este contexto, también es sabido que la unidad mínima funcional de la porina es un trímero y que el análisis de la estructura tridimensional, reconstituida por microscopía electrónica, sugiere que existen tres conductos abiertos en la superficie de la membrana, los cuales se fusionan en un solo canal hacia el espacio periplásmico (33). También ha sido observado que esta estructura está fundamentalmente formada por hojas beta-plegadas anti-paralelas y que esta conformación favorece su disposición en la membrana. Ello permite la exposición de ciertas regiones hacia el exterior de la bacteria, fig.2 (59,99). La exposición de regiones de Pho E en la superficie lo comprueba el hecho de que algunas de ellas funcionan como parte del receptor del fago TQ45 (18) y de colicinas (36).

Tomassen, et al, han realizado múltiples estudios en torno al papel que juegan las diferentes regiones de la proteína. De este modo se ha visto, mediante la construcción de genes híbridos phoE-ompF y bla-phoE, que el péptido señal es una señal de exportación, la cual funciona independientemente de la secuencia estructural; y que la información que determina la localización última de la proteína en la M.E., se encuentra contenida en la secuencia estructural de esta proteína y no en la secuencia señal (115). A su vez, el análisis con el gene híbrido bla-phoE sugiere que el extremo amino terminal de esta proteína se encuentra probablemente hacia el espacio periplásmico (116). Estudios posteriores con otro gene híbrido ompF-phoE, en el cual los residuos 2-73 del extremo amino de Pho E, están sustituidos con la

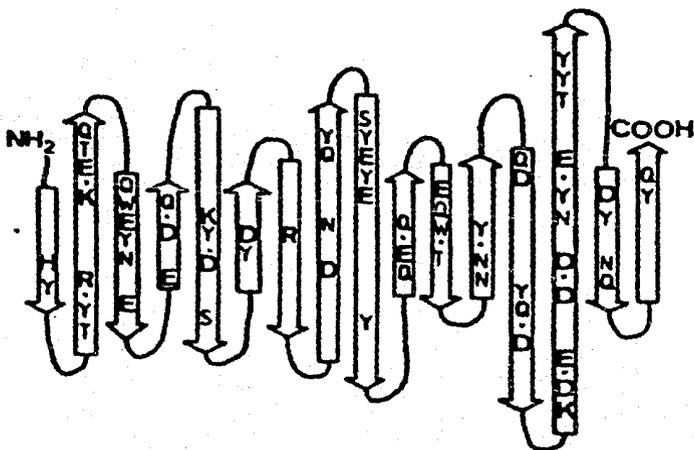


FIG.2.- Representación de la estructura fundamental del monómero de una porina, en el que se observa la disposición de las hojas beta-plegadas antiparalelas y las vueltas que favorecen la exposición de regiones hacia el exterior de la célula.

region homóloga del gene ompF, indican que la preferencia de Pho E por compuestos aniónicos está en parte determinada por los 73 aminoácidos del amino terminal; que parte del sitio receptor para el fago TC45 está localizado en esta región de la proteína; y que ésta atraviesa por lo menos una vez la membrana (117). Por otra parte, la construcción del gene híbrido phoE-lacZ, el cual codifica para 300 aminoácidos del amino terminal de Pho E y para casi la beta-galactosidasa completa, muestra, aunque no de manera muy clara, que el fragmento de 50aa del extremo carboxilo terminal son necesarios para el transporte de la proteína (118). Siguiendo la misma línea, técnicas de recombinación "in vivo", permitieron la construcción de genes híbridos ompC-phoE en los cuales el DNA que codifica para una parte de la proteínas es reemplazado por la parte correspondiente del otro gene. Los productos de estos genes indican que existen 3 regiones dentro de los primeros 130aa, las cuales confieren las características de poro; además de que entre los residuos 75-110 se determina la especificidad para fagos. También se observa que la región que está más expuesta en la superficie celular se encuentra entre los residuos 142 y 267; esta región contiene residuos requeridos para la unión de anticuerpos monoclonales dirigidos contra las partes expuestas de Pho E (119). Recientemente se ha observado, mediante la utilización de deleciones a lo largo de todo el gene phoE, que aparentemente ninguna parte de la proteína, a excepción del péptido señal, es esencial para el transporte. Sin embargo, tomando en cuenta que ninguna de las proteínas truncadas aparecen en la membrana externa, se propone que la información para la inserción en esta membrana está dada por la estructura total (secundaria o terciaria) de la proteína, la cual probablemente se ve afectada por todas las deleciones realizadas para

este estudio (12).

La comparación, a diferentes niveles, de las porinas Omp F, Omp C y Pho E hacen suponer la existencia de un ancestro común a partir del cual estas proteínas se diversificaron. De este modo, el estudio de heteroduplex formados por el gene ompF y el gene phoE muestra que existe una gran homología entre ellos y que las secuencias de DNA parecen estar fuertemente conservadas. Ello se refleja en la existencia de propiedades comunes como la asociación a peptidoglicana, la interacción con el LPS y la función de poro. Sin embargo, este estudio señala que la homología esta menos conservada en una región de aproximadamente 140pb, lo que sugirió que esta región podía ser responsable de determinar propiedades diferentes, como los sitios receptores a distintos fagos (120). La comparación de las secuencias indica que entre ompF y phoE existe alrededor de un 63% de homología (95), lo que de manera similar se encuentra para ompC y phoE (79,91). En otros estudios, Overbeeke, et al, han observado que las porinas están antígenicamente relacionadas (97).

La expresión de Pho E bajo las condiciones antes descritas está acoplada a un complejo mecanismo, el cual asocia una variedad de genes diferentes. Además, Pho E se expresa de manera coordinada Junto con, por lo menos, 18 proteínas más. De estas, las más importantes son la fosfatasa alcalina (phoA) y la proteína que se une a fosfato (phoS), entre otras, las cuales forman lo que se ha denominado el regulón Pho. (112).

Los estudios realizados hasta ahora indican que los genes involucrados en la regulación positiva son principalmente, phoB, phoK y phoH. De estos, parece ser que la cantidad del producto de phoB está regulando positivamente los niveles de expresión del regulón (103). Este, a su

vez, está siendo regulado también positivamente por el producto de phoM, el cual sustituye la función reguladora positiva de phoR (73). El locus phoR también puede actuar como regulador negativo en alto fosfato (43,74,103). Los genes phoB y phoR han sido clonados y constituyen un operón localizado en el minuto 9 del mapa cromosomal de E.coli (121). La secuencia del gene phoB ya ha sido deducida y muestra que contiene una secuencia consenso denominada la "caja fosfato" similar a la de las regiones reguladoras de los genes phoA, phoS y phoE; lo que a su vez hace pensar que phoB se autorregula positivamente (75). La regulación negativa la llevan a cabo una serie de genes organizados en el operón pst en el minuto 84 del mapa genético de E.coli (72,106). Estos son los genes phoS, phoT, pstB y phoU; el fragmento donde están contenidos como cistrones independientes ya ha sido clonado (1).

No se conoce con certeza como se efectúa la regulación negativa de phoB a partir de estos genes, pero se sabe que phoS, phoT y pstB están involucrados en el sistema altamente específico de transporte de fosfato (2,107) y que mutantes en cualquiera de estos genes expresa constitutivamente los genes del regulón Pho (1). Se postula que el fosfato inorgánico, transportado por los productos de estos genes, da como resultado la represión del operón phoB-phoR por un mecanismo desconocido; que podría ser el afectar los niveles de un efector hipotético. Por su parte el gene phoU posiblemente codifica para un represor, el cual regula negativamente la expresión de phoB junto con el producto de phoR; o tal vez está involucrado en la formación de un efector para el represor (87). Los genes antes mencionados ya han sido secuenciados y caracterizados (72,106,107).

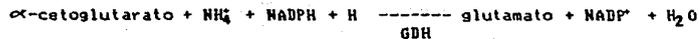
Finalmente, el estudio de esta proteína en otras enterobacterias

está muy limitado. Se sabe que en S.typhimurium se induce bajo limitación de fosfato, una proteína de 34,000 daltones la cual probablemente represente la proteína Pho E (7). Recientemente se ha reportado información que apoya estos datos. Bauer, et al., encontraron que una mutante de S.typhimurium constitutiva para el regulón Pho expresa una nueva PHE, la cual tiene selectividad para compuestos cargados negativamente (3). Este regulón ha sido identificado por Foster, et al., y a pesar de que en S.typhimurium no existe el gene phoA de la fosfatasa alcalina, los genes que componen este regulón también responden a la limitación de fosfato (35). Además de S.typhimurium, PHE inducibles por este mecanismo han sido identificadas en Pseudomonas aeruginosa con un peso molecular aparente de 48,000d, la cual se coinduce con la fosfatasa alcalina y la fosfolipasa C (48-49); y en Enterobacter cloacae, de la cual el gene ya ha sido clonado. El estudio de esta última indica que se expresa normalmente en E.coli y que comparte propiedades con la proteína Pho E de E.coli, como son la de servir de receptor del fago TC45 y formar poros con sitio de reconocimiento para compuestos aniónicos (123).

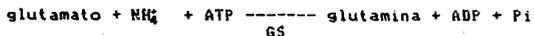
LA ENZIMA GLUTAMATO SINTASA (GOGAT)

Para todos los sistemas biológicos el nitrógeno es indispensable para la biosíntesis de macromoléculas que son esenciales para el crecimiento celular. En las enterobacterias como E.coli y S.typhimurium no existe un mecanismo que les permita asimilar el nitrógeno atmosférico. Para que el nitrógeno pueda ser incorporado, la célula requiere encontrarlo en forma de compuestos inorgánicos simples como amonio, nitritos o nitratos; de donde es transferido a moléculas orgánicas más complejas como el glutamato y la glutamina. Estas son los principales donadores de nitrógeno en la biosíntesis de otros compuestos. El glutamato es el grupo primario amino donador de la síntesis de prácticamente todos los aminoácidos, mientras que el grupo amido de la glutamina es el donador de nitrógeno en ciertos pasos durante la biosíntesis de algunos aminoácidos, purinas, pirimidinas y ciertos otros compuestos necesarios para la célula. (Fig.3).

La asimilación de nitrógeno en glutamato y glutamina a partir de amonio está mediada por dos enzimas: la glutamato deshidrogenasa (GDH) dependiente de NADP, la cual sintetiza glutamato a partir de alfa-cetoglutarato y amonio:



y la glutamino sintetasa (GS) dependiente de ATP que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato, amonio y ATP:



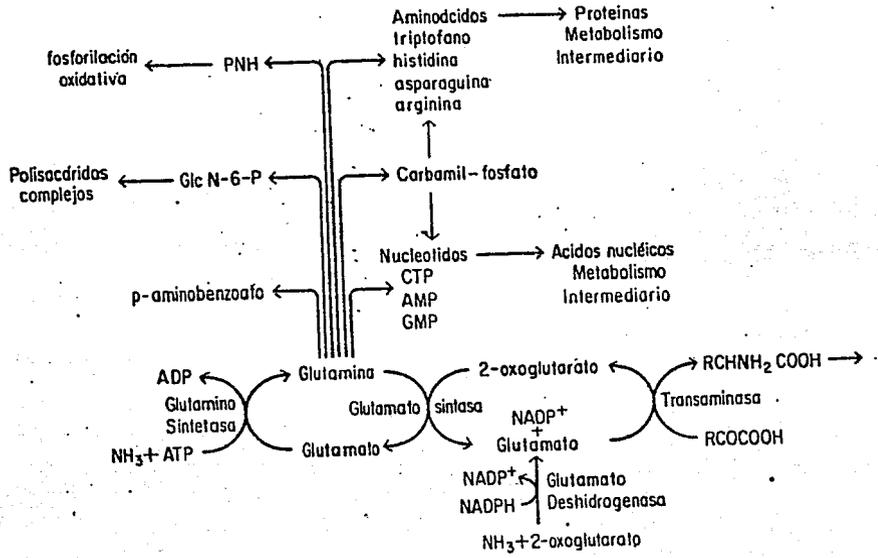
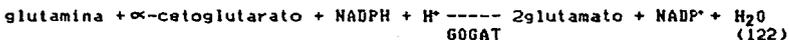


FIG.3.- Ciclo de asimilación de nitrógeno en bacterias.

Una tercera enzima, la glutamato sintasa (GOGAT) puede catalizar la transferencia del grupo amido de la glutamina al carbono alfa del alfa-cetoglutarato, lo que resulta en la producción de dos moléculas de glutamato:



Desde el punto de vista funcional, la actividad de GOGAT es requerida para el crecimiento de E.coli y S.typhimurium, entre otras enterobacterias, en condiciones de limitación de amonio como fuente de nitrógeno. Su importancia como proveedora de glutamato a la célula en bajas concentraciones de amonio hace a esta enzima interesante para su estudio en otros microorganismos.

Estudios bioquímicos de la GOGAT en E.coli muestran que esta proteína es una enzima multimérica compuesta de un agregado de cuatro dímeros catalíticamente activos, cada uno de los cuales contiene subunidades distintas; la subunidad grande tiene un peso molecular aparente (PMA) de 135,000d y la chica de 53,000d, siendo el multímero de aproximadamente 800,000d. (77). Datos recientes parecen indicar que la subunidad grande pesa en realidad aproximadamente 166,000d. (Bece-rril, B. comunicación personal).

Los genes (gltB), que codifican para estas dos subunidades, han sido clonados (26). Estos están contenidos en el plásmido PRSP20 en un fragmento de aproximadamente 8.4 Kb y están organizados en tandem (65). La subclonación de los genes para las dos subunidades ha permitido demostrar que estas se transcriben en una sola dirección, iniciándose

en el gene de la subunidad grande. Por otra parte, al parecer el gene de la subunidad chica tiene su propio promotor ya que ésta se sintetiza en minicélulas (41). Datos recientes sobre la secuencia de estos genes apoyan esta idea; además hay indicios de la existencia de un tercer gene que pudiera estar involucrado en la regulación de GOGAT (Bece-rrii, B. comunicación personal).

La presencia de GOGAT ha sido demostrada para otras enterobacterias como Klebsiella aerogenes, donde la subunidad grande pesa 175,000d y la chica 51,500d; y para S. typhimurium donde los estudios señalan que los genes, al igual que en E. coli, están continuos y se expresan en una sólo dirección a partir de la subunidad grande (gltB) hacia la chica (gltD) (39,71).

CONSTRUCCION DE UN BANCO DE GENES

Un banco o biblioteca de genes es una colección de moléculas recombinantes de DNA en las que se encuentra representado el genoma de un organismo. Ello permite el aislamiento de genes particulares con el fin de analizar su estructura y función. Al construir un banco, se busca tener múltiples copias idénticas o clonas de segmentos diversos de DNA del organismo de interés. Para ello se forman moléculas recombinantes con vectores de clonación. Estas son moléculas de DNA con replicación independiente a la del cromosoma del huésped. Por lo general el DNA del organismo a estudiar (DNA pasajero) y el vector de clonación se cortan en sitios específicos con una misma endonucleasa de restricción, generando moléculas recombinantes mediante la unión de estos fragmentos con ligasa del fago T4.

Los dos vehículos procariontes comúnmente usados son los plásmidos de E.coli y los derivados del colifago lambda; cada colonia o placa de lisis, respectivamente, contiene múltiples copias de un segmento particular del genoma. El número de moléculas recombinantes que se requieren para tener un genoma completamente representado depende del tamaño del inserto en el vehículo y del tamaño de dicho genoma (21). El tener clonado el equivalente a 5 veces la extensión del genoma implica una probabilidad de 0.99 de que se encuentren representados todos los genes.

EL COLIFAGO LAMBDA COMO VECTOR DE CLONACION

El bacteriófago lambda infecta E.coli y puede crecer como lisógeno incorporándose al cromosoma del huésped y duplicándose junto con él. También puede lisis a la célula después de haber producido varias decenas de copias; es decir, entra en fase lítica. Un fago en fase

lítica puede funcionar como vector de clonación. Se han construido derivados del fago lambda cuyo DNA, al ser digerido con enzimas de restricción, genera fragmentos dispensables e indispensables para su crecimiento lítico. Los derivados de lambda adaptados específicamente para la clonación de DNA están contruidos de tal manera que las endonucleasas de restricción sólo tengan sitios de reconocimiento en la región dispensable, de modo que permitan la adición o reemplazamiento de DNA exógeno pasajero.

Las moléculas recombinantes son encapsuladas in vitro; los fagos recombinantes son amplificados mediante su propagación sobre un césped de E.coli.

Los derivados de lambda que tienen un sólo sitio blanco en el DNA se conocen como vectores de inserción. Los que tienen sitios de reconocimiento pares, que permiten remover un segmento y reemplazarlo con DNA heterólogo, son conocidos como vectores de reemplazamiento, en los cuales es necesario el corte eficiente de los sitios blanco de las enzimas de restricción en el DNA vector.

EL BACTERIOFAGO LAMBDA

El colifago lambda (38) consta de una molécula de DNA de doble cadena de 48 502 pares de bases (pb). En cada extremo de su genoma hay proyecciones de cadena sencilla complementarias; estos extremos cohesivos de 12 pb son llamados m y m' y forman el sitio cos. El DNA de lambda puede ser dividido en 3 regiones. La región del extremo izquierdo contiene los genes A-J que codifican para proteínas de la cápsula y cola del fago, así como para proteínas involucradas en el ensamble de proteínas virales maduras. La región central, entre los genes J y N, contiene el gene cIII y genes cuyos productos intervienen en procesos generales de recombinación y de estructuración de la forma tardía de

replicación del fago. Estos últimos genes (función Red), determinan que el fago lambda sea sensible a inhibición por lisógenos del fago P2 y son dispensables para su crecimiento lítico. La región del extremo derecho incluye: la región principal regulatoria de la expresión genética, es decir los genes N, cI, cro y cII; los genes O y P necesarios para la replicación del fago; y los genes S y R cuyos productos son requeridos para la lisis de la membrana y pared celular del huésped, respectivamente (fig.4). De las aproximadamente 50 proteínas para las que codifica lambda, seis son regulatorias: cI, cII, cIII, cro, N y Q. Su expresión da lugar a un circuito de expresión genética que permite al fago entrar en una fase lítica o en una lisogénica (38,53).

Un fago lambda que funcione como vehículo molecular puede prescindir de aproximadamente más del 40% (20 000 pb) de su genoma, el cual puede ser sustituido por DNA pasajero. Para poder ser encapsuladas, las moléculas de DNA de lambda deben tener un tamaño entre el 80 y el 108% del tamaño del fago silvestre, así como la secuencia cos.(34).

El uso del colifago lambda como vector de clonación de DNA genómico es un método atractivo, ya que pueden generarse rápidamente un gran número de placas de lisis de fagos recombinantes, utilizando pequeñas cantidades de DNA pasajero (128).

EL FAGO LAMBDA 1059

En 1980, Karn, et al (57), reportaron la construcción del fago vector lambda 1059, el cual presenta un sistema de selección positiva para los fagos recombinantes. El fago lambda 1059 está formado por 3 fragmentos generados por cortes con la endonucleasa de restricción BamHI: uno de 19,600 pb que corresponde al brazo izquierdo y que lleva

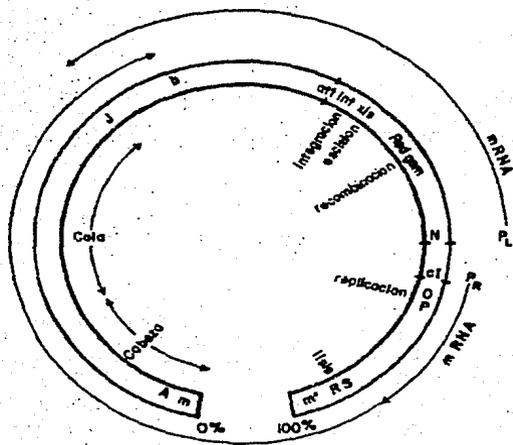


FIG.4.- Mapa genético y funcional del DNA de lambda.

todos los genes para las proteínas de la cabeza y la cola; un segmento interno de 17,000 pb que corresponde a la región dispensable para el crecimiento lítico del fago; y uno de 9,400 pb, el brazo derecho, que lleva los genes de duplicación y lisis. Los 2 brazos del vector contienen los genes necesarios para la duplicación y maduración de lambda 1059 y corresponden a 58.2% del genoma del tipo silvestre. La producción de fagos viables se lleva a cabo cuando se reemplaza el segmento interno con fragmentos de DNA que representen del 12.8 al 49.8% del tamaño del fago silvestre (6.3 - 24.4 Kpb). Los dos brazos por sí solos no producen fagos viables, ya que para la encapsulación se requieren genomas con un tamaño entre 70 y 108% de la longitud total del fago silvestre.

El sistema de selección para recombinantes está basado en el fenotipo Spi; este fenotipo le confiere a lambda sensibilidad a inhibición por P2. El segmento interno contiene los genes red y el gamma, responsables del fenotipo Spi+. Por tanto, cuando los brazos del vector, cortados con BamHI, son ligados con DNA exógeno, se producen fagos padres y recombinantes. Los recombinantes sustituyeron el fragmento interno y serán Spi-; se distinguirán de los padres al crecer sobre un césped de células E.coli lisogénicas para el fago P2 (Fig.5).

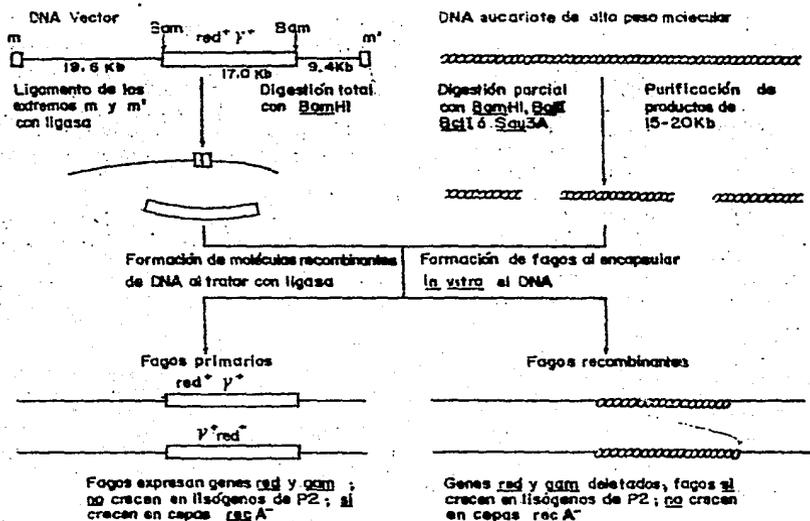


FIG.5.- Clonación en lambda 1059. El esquema representa la estrategia seguida para la construcción del banco de DNA de S. typhi; la fracción utilizada para el aislamiento de los fagos lambda PBC217 y lambda LPC1 fue preparada a partir de parciales de Sau3A.

OBJETIVOS

Con base en el parentesco existente entre S.typhi y E.coli, nos avocamos a la tarea de localizar en el genoma de S.typhi, secuencias homólogas a los genes gltB y phoE de E.coli, utilizando estos como detectores heterólogos de hibridización. Habiendo obtenido una señal definida, esto es, identificado bandas de restricción generadas por la formación de un heteroduplex entre el detector y el DNA de S.typhi, procedimos a la búsqueda de estas secuencias dentro de un banco de DNA de S.typhi construido en el laboratorio en el vector de clonación lambda 1059, para así, aislar las clonas independientes que portaran estos genes. Con la ayuda de estrategias desarrolladas durante el trabajo de investigación, que nos llevaron al uso eficiente del banco, se obtuvieron dos fagos recombinantes los cuales portan las secuencias parcialmente homólogas a los genes gltB y phoE de E.coli. Estos, con el propósito de realizar posteriores experimentos como la subclonación en plásmidos, fueron mapeados para diferentes enzimas de restricción.

MATERIALES

1) CEPAS BACTERIANAS

- Salmonella typhi 9.12,d,Vi (52).
- Escherichia coli Q359 (hsdR-,hsdM-,supE, O80,P2) (57).
- Escherichia coli CE1222 (F-,thr,leu,del,proA2 (proA-phoE-gpt)his,thi,argE,lacY,galK,xyl,rpsL,phoS21,recA56,ompR) (115).
- Escherichia coli M159 (recA,uvrA) (16).

2) PLASMIDOS

- pJP14, utilizado como detector heterólogo de hibridación (114).
- pRSP20, utilizado como detector heterólogo de hibridación (26).

3) BACTERIOFAGO

- Lambda 1059, usado en la construcción del banco de genes de S.typhi (57).

4) MEDIOS DE CULTIVO

- M9, LB, SM, descritos por Maniatis (76).
- NZCYM, descrito por Blattner (10).
- CY, descrito por Karn, et al (57).
- CM, descrito por Clarke, et al (20).

5) ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

- BamHI, EcoRI, Sall, (Amersham)
- HindIII, ClaI, SphI, SmaI, EcoRV, XhoI, XbaI, (Promega Biotec)
- BglII, PstI y BamHI (Producidas por el CE1NGEBI).

6) ANTIBIOTICOS

- Cloramfenicol, Tetraciclina y Ampicilina (SIGMA)

7) OTRAS ENZIMAS

-Ribonucleasa y Desoxirribonucleasa (SIGMA)

8) FILTROS PARA SOUTHERN

-Gene Screen (NEW ENGLAND NUCLEAR, DUPONT)

9) OTROS MATERIALES

-Isótopos Radiactivos:

-Metionina/azufre 35 ca.800 Ci/mmol (Amersham # cat. SJ.235)

-Alfa-deoxi-CTP/fosforo 32 ca.3000 Ci/mmol (Amersham # cat. PB.10205, ICM # cat. 33004X)

-Agarosa de bajo punto de fusión (Seak-em)

METODOS

1) PREPARACION DE DNA BACTERIANO

La extracción y purificación del DNA de las bacterias E.coli Q359 y S.typhi 9,12,d,Vi se realizó siguiendo la técnica de lisado claro reportada por Bellach, et al (9).

2) PREPARACION DE DNA DE PLASMIDO

El método utilizado para la purificación de los plásmidos utilizados en este trabajo, es el de lisis alcalina descrito por Maniatis, et al (76). El DNA del plásmido se preparó por amplificación del número de copias, en cultivo en fase logarítmica, por adición de cloramfenicol (22).

3) MINIPURIFICACION DE DNA DE PLASMIDO

El metodo utilizado está también descrito por Maniatis, et al (76) y consiste en la semipurificación del plásmido en pequeñas cantidades con el fin de caracterizar o identificar el plásmido rápidamente.

4) PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION

El metodo es descrito por Maniatis, et al (76) y consiste en la purificación de fragmentos de restricción de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Los fragmentos son útiles tanto como sondas radioactivas, como para ser subclonados.

5) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El metodo usado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA es por medio de electroforesis en geles de agarosa. Las preparaciones de DNA, tanto bacteriano como de plásmido, fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1% (Bio-Rad). Se utilizó una solución amortiguadora TAE (Tris, EDTA, Acetato de Potasio), a 100 volts, como reportan Bolivar, et al (11). Los geles se tinen con una solución de 0.5µg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma) durante 5 minutos. El DNA se visualiza con luz ultravioleta de onda corta de un transiluminador (Ultraviolet Products).

6) DIGESTIONES DE DNA BACTERIANO, PLASMIDOS Y FAGOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las condiciones para digerir con enzimas de restricción se estandarizaron para utilizar solamente tres soluciones distintas segun los requerimientos de cada enzima:

BUFFER:	BAJO	MEDIO	ALTO
-NaCl	-	50mM	100mM
-Tris-HCl (pH 7.5)	10mM	10mM	50mM
-HgCl ₂	10mM	10mM	10mM
-Ditiotreitol	1mM	1mM	1mM

MEZCLA DE REACCION:

- Agua
- Buffer (1X)
- DNA (Entre 1-3µg)
- Betamercaptoetanol 1% (1µl/20µl de reacción)
- Espermidina (4mM)
- Enzima (Entre 3-5u/µg de DNA)

Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 37°C (excepto PstI a 30°C) y se detuvieron calentando a 65°C por 10' y agregando 1X de solución de parar (0.25% azul de bromofenol, 0.25% cianol de xileno y 15% ficol tipo 400 en agua).

7) HIBRIDIZACION DE ACIDOS NUCLEICOS

La hibridización de fragmentos de DNA separados por electroforesis y transferidos a filtros (Gene Screen) se hizo de acuerdo a la técnica de Southern (105). El horneado, prehibridización, hibridización, y lavado se hizo de acuerdo a Maniatis (76) y la autorradiografía de los filtros se realizó de acuerdo a Swanstron y Shank (109).

8) HIBRIDIZACION EN PLACA (BENTON Y DAVIS)

La hibridización en placa se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Benton y Davis (5). Consiste en la absorción y fijado del DNA de las placas de lisis, generadas por los fagos recombinantes, a filtros de nitrocelulosa, para posteriormente hibridizarlo contra el detector deseado.

9) MARCAJE DE DNA "IN VITRO" CON FOSFORO 32

El marcaje interno con nucleótidos radioactivos, de las moléculas de plásmido o de fragmentos de DNA que se utilizaron como detectores heterólogos de hibridización, se realizó de acuerdo a la técnica de "Nick Translation" (Traslado de corte) descrita por Rigby, et al (102).

10) CRECIMIENTO DE LOS FAGOS RECOMBINANTES Y PURIFICACION DE DNA

El crecimiento de los fagos recombinantes se hizo como lo describen Karn, et al (57). La purificación de DNA en gradiente de CsCl se efectuó de acuerdo a la técnica que describe Maniatis, et al (76).

11) MINIPURIFICACION DE FAGOS RECOMBINANTES

Se inoculan 42ml de NZCYH con una solución que contiene: 0.1ml de fagos recombinantes en SM; 0.1ml de un cultivo de toda la noche de la cepa receptora Q359 crecida en CY más 0.2% maltosa; y 0.1ml de 1M Ca y Mg, previamente incubada a 37°C por 20 minutos. Después de incubar durante toda la noche a 37°C con agitación, se agregan 0.5ml de cloroformo y se dejan 15' con agitación a 37°C. Se adicionan 2µg/ml de DNasa y 4.5µg/ml de RNasa incubándose 30' a temperatura ambiente. Se agrega 2.4 gr de NaCl y se centrifuga por 30' a 7,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se centrifuga a 25,000 rpm durante 90' a temperatura ambiente en el rotor SW28. La pastilla se resuspende en 0.4ml de 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) y 0.3M NaCl y se transfiere a tubos Eppendorff de 1.5ml. Se trata con 50µg/ml proteinasa K, 0.1% SDS y 1mM EDTA por 60' a 65°C. Se extrae una vez con fenol 1:1 (v/v), dos veces con una mezcla de fenol-CHCl₃-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y una con CHCl₃-alcohol isoamílico (24:1 v/v). La fase acuosa se precipita con dos y medio volúmenes de etanol frío a -20°C; se centrifuga durante 15' en una microfuga Eppendorff, se decanta el sobrenadante y se seca la pastilla

al vacío. Se resuspende en 0.1ml de agua bidestilada filtrada y estéril y se estima la concentración de DNA en un gel de agarosa al 1%.

12) ANALISIS DE PROTEINAS EN MAXICELULAS

Se analizó la expresión selectiva de las proteínas producidas por los fagos recombinantes derivados de lambda 1059, en la cepa M159 de E.coli. Esta cepa es una mutante uvrA, recA, donde puede suprimirse la síntesis de proteínas endógenas, después de irradiación con luz ultravioleta, y expresar únicamente las proteínas codificadas por los genes del fago (16). Estas proteínas pueden ser detectadas mediante su marcaje selectivo "in vivo", usando aminoácidos radioactivos, seguido de electroforesis en gel y autorradiografía.

13) ELECTROFORESIS EN GELES DE SUS-POLIACRILAMIDA PARA ANALISIS DE PROTEINAS

Las preparaciones de proteínas fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 11.5% preparados de acuerdo al método descrito por Laemmli (62). La electroforesis se realizó en una solución amortiguadora de Tris-Glicina y SDS, a 20mA para el gel superior y 40mA para el gel inferior. La tinción se realiza con una solución de azul de Coomassie (0.01% en ácido acético al 10%) a 80°C durante 15' y se destina a la misma temperatura con ácido acético al 10%. Se seca con vacío y se expone a una película de rayos X.

14) MAPEO PARCIAL DE RESTRICCIÓN

El mapa de restricción de los fagos aislados se construyó a base de digestiones dobles y sencillas del DNA con enzimas de restricción diferentes y mediante hibridización de los patrones generados en gel con los detectores utilizados para este trabajo.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DEL FAGO LAMBDA PBC217 (GOGAT)

Siendo S.typhi un organismo muy relacionado filogenéticamente a E.coli, surgió el interés común entre nuestro grupo y el del Dr. Bolívar, el cual realiza gran parte de su trabajo con genes del metabolismo nitrogenado de E.coli, de rastrear los genes que codifican para las enzimas GDH y GOGAT en el genoma de S.typhi.

Con el propósito de localizar en S.typhi las secuencias correspondientes al gene gltB, se utilizó como detector heterólogo de hibridización el plásmido PRSP20 (proporcionado por el grupo del Dr. Bolívar) fig.6, el cual porta los genes que codifican para las dos subunidades de la glutamato sintasa (GOGAT) de E.coli. Los genes para la subunidad grande de 166,000d y la subunidad chica de 57,000d de GOGAT, se encuentran codificados en tandem formando un operón en el cromosoma de Escherichia coli. (77).

DNA total de S.typhi 9,i2,d,Vi fue digerido con la enzima de restricción BglII y con una doble digestión con BamHI y BglII. Posteriormente fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%; fué transferido a membranas tipo "Gene Screen"; e hibridizado mediante la técnica de Southern (105), a 42°C y con 40% formamida. Se utilizó como sonda el plásmido PRSP20 (65) marcado radioactivamente con fosforo 32. Como se puede observar en la figura 7 el patrón con la doble digestión (carril b), genera dos bandas principales de hibridización de aproximadamente 4.2 y 1.6 kb. La intensidad de la hibridización nos indicaba que muy probablemente la mayor parte del gene estaba contenido en la banda de 4.2 Kb. Este patrón fué seleccionado para rastrear esta secuencia en el banco de DNA de S.typhi construido en el laboratorio en

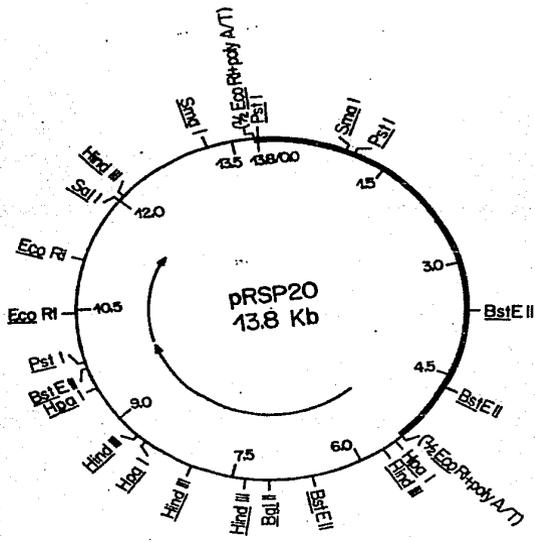


FIG.6.- Plásmido PRSP20. En él se encuentra clonado el fragmento que porta los genes para las dos subunidades de GOGAT.

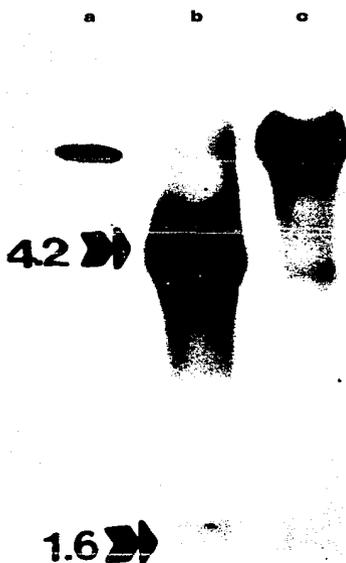


FIG.7.- Localización del gene de GOGAT en el genoma de *S.typhi*. Hibridización tipo Southern, contra el pRSP20 marcado radioactivamente con fosforo32, de: a) pRSP20 linealizado como control positivo de hibridización; b) DNA total digerido con BamHI-BglII y; c) DNA total digerido con BglII. Las flechas indican el patrón de bandas que fue utilizado para rastrear el gene dentro del banco de DNA construido en lambda 1059.

el vector de clonación lambda 1059. (Ver estrategia de construcción en la fig.5).

Con este antecedente, doce agrupaciones, de aproximadamente cien fagos recombinantes diferentes cada una, fueron amplificadas por separado para extracción de DNA. Estos 1200 fagos distintos, generados a partir de eventos primarios de empacamiento, representan aproximadamente 4.5 veces el genoma completo de S.typhi. El DNA de los fagos fue digerido con las mismas enzimas de restricción que para DNA total e hibridizado de igual manera mediante la técnica de Southern. El resultado de esta hibridización se observa en la fig. 8, donde las agrupaciones 3 y 11 presentan el mismo patrón previamente observado en la hibridización contra genoma total. Las otras bandas que se observan en esta autorradiografía son bandas generadas por la hibridización del plásmido vector del detector utilizado, con ciertas regiones homólogas del fago vector, como son la resistencia a ampicilina y cierto fragmento del origen de replicación. Estos fagos no son recombinantes y no son excluidos por el sistema de selección positiva de recombinantes, debido a que sufren rearrreglos con los cuales evitan la inhibición por P2 (ver introducción). Estas señales fueron caracterizadas mediante la hibridización de un filtro idéntico al utilizado para la autorradiografía de la fig.8 contra pBR322 marcado radioactivamente (datos no mostrados), el cual es el vector en el que está clonado el gen gltB de E.coli, pero sin DNA pasajero. Este experimento reveló que las bandas observadas en las agrupaciones 3 y 11, son producto de los genes clonados en el pRSP20 y no de las homología presentadas por los vectores.

El resultado anterior nos permitió delimitar la clona de interés a dos agrupaciones de aproximadamente cien fagos diferentes cada una.

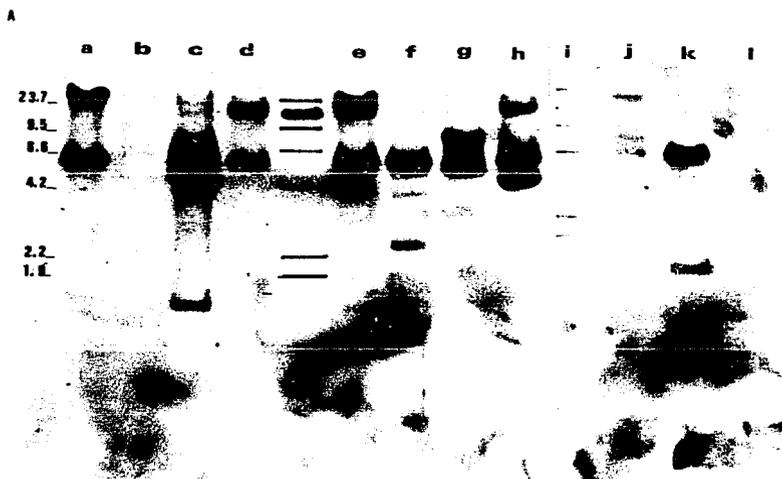


FIG.8.- A) Hibridización tipo Southern del DNA de 1200 fagos recombinantes diferentes, cortado con BamHI-BglII, divididos en doce agrupaciones de 100 fagos cada una, contra el PRSP20 marcado radioactivamente. Notese que los grupos 3 y 11 (carriles c y k) generan el mismo patrón observado en DNA total.



B) Patrón electroforético generado por el corte con BamHI-BglII en el DNA de las doce agrupaciones de 100 fagos en gel de agarosa con tinción de Bromuro de Etidio. Lambda HindIII como marcador de peso molecular.

Para continuar los experimentos se seleccionó la agrupación 11 que era la de señal más limpia.

Con el fin de obviar el subagrupamiento de los 100 fagos de esta agrupación, donde se encontraba la clona que contenía la secuencia parecida al gene gltB, estos se plaquearon sobre un césped de células de la cepa Q359 en una caja de petri de 14cm de diámetro, conteniendo bactotripton-agar. Previa incubación a 37°C durante toda la noche, el DNA liberado de las placas de lisis (aproximadamente 150) generadas en el agar, fue transferido a filtros de nitrocelulosa durante 1 y 3 minutos e hibridizado contra el pRSP20 a 42°C y con 40% formamida como describen Benton y Davis (5). Después de 24 horas de incubación los filtros fueron lavados con una solución de hasta 1X SSC y expuestos a una película de rayos X. La fig.9 presenta la autorradiografía del filtro transferido durante 1 minuto; en él se señalan con una flecha las 6 placas seleccionadas como positivas. Las clonas 1 y 2 fueron seleccionadas como las más probables por presentar mayor intensidad de hibridización.

Estas 6 clonas fueron aisladas del resto extrayendolas del agar con la parte superior de una pipeta Pasteur y eluidas en 1ml de solución SM (cada placa da títulos aproximados de 10 fagos). Para comprobar de manera independiente la hibridización positiva de estas clonas, cada una fue amplificada en líquido para extracción de DNA. Aproximadamente 3µg de DNA de cada fago fueron digeridos con las enzimas de restricción BglII y BamHI como en los experimentos iniciales y mediante Southern hibridizados contra los fragmentos PstI-BglII de 3,000 pb y EcoRI-EcoRI de 800 pb del plásmido pRSP20 que portan únicamente secuencias del gene gltB de E.coli, fig.6. Los fragmentos habían sido previa-



FIG.9.- Hibridización en placa tipo Benton-Davis de los 100 fagos diferentes contenidos en la agrupación II, seleccionada en el experimento anterior, contra el pRSP20 marcado radioactivamente. Las seis placas seleccionadas como positivas se encuentran numeradas.

mente purificados mediante un gel de agarosa de bajo punto de fusión (ver metodos), con el propósito de eliminar las bandas generadas por la hibridización entre las regiones de los vectores que comparten homología. La fig.10 muestra esta hibridización y en ella se puede ver que los fagos 1 y 2 (carriles a y b), seleccionados como los más probables, dan el patrón observado que para DNA total. Con esto, dos clonas independientes del banco, las cuales portan el gene o parte del gene glB de S.lyphi, fueron aisladas.

Para determinar la pureza de una de las clonas, ésta fue plaqueada a baja densidad y, después de incubarlas toda la noche a 37°C, 6 placas al azar se escogieron para extracción de DNA. En la fig.11 se observa el patrón de restricción generado por las enzimas utilizadas para el aislamiento de este fago, el cual es el mismo en los 6 casos por lo que se determinó que es un fago único. Este fago se denominó lambda PBC217.

Tratando de caracterizar el producto de la expresión de los genes clonados en el lambda PBC217, se utilizó la cepa de E.coli M159 (16) para realizar experimentos de maxicélulas (ver metodos). La fig.12 muestra el resultado de este experimento, el cual no permitio obtener resultados claros, ya que bandas alrededor del peso molecular esperado no son observadas en el carril donde estan las proteínas de "novo" del lambda PBC217. La presencia de una banda clara alrededor de 25,000 daltones hace pensar en la posibilidad de que esta pertenezca a la subunidad chica, la cual puede estar truncada o ser un peptido de menor tamaño al reportado para E.coli. Las características del gel no permiten ver la subunidad grande que pudiera ser mayor de 150,000 daltones, en analogía a la de E.coli. Los intentos por ver una banda correspondiente a la subunidad grande en geles de menor concentración no tuvieron éxito (datos no mostrados); sin embargo, parece haber indicios de

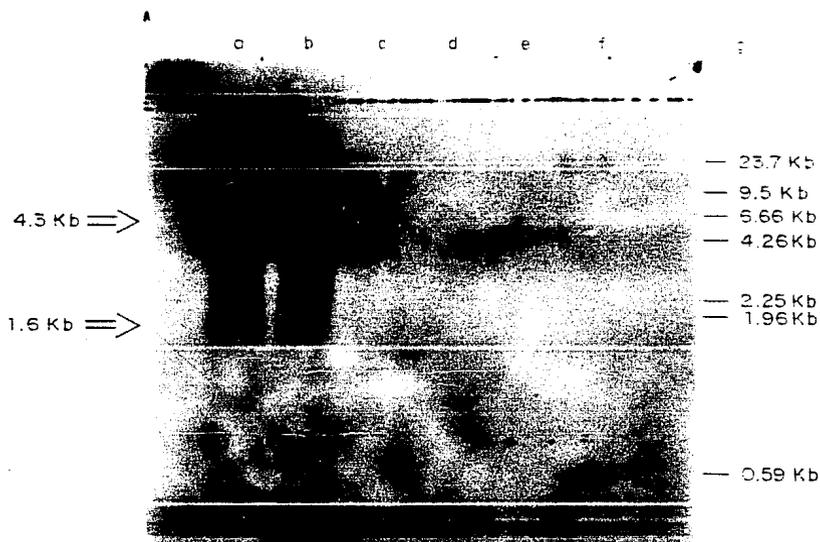
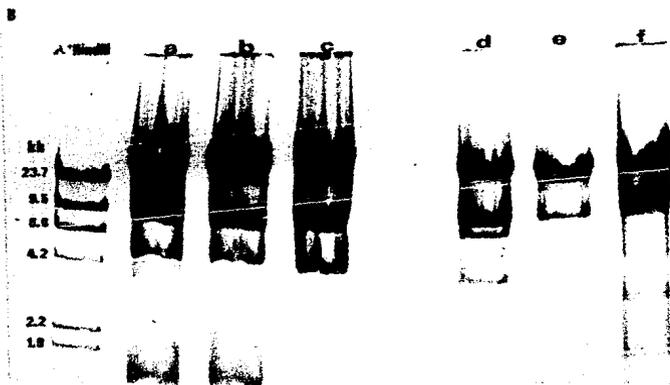


FIG.10.- A) Hibridización tipo Southern del DNA, cortado con BamHI -BaIII, de los seis fagos aislados mediante Benton-Davis (carriles a-f) contra los fragmentos del pRSP20 que portan únicamente secuencias correspondientes a los genes de GOGAT (ver texto); g) lambda HindIII como marcador de peso molecular.



B) Patrón de restricción generado por BamHI-BglII en el DNA de los seis fagos aislados, en gel de agarosa con tinción de Bromuro de Etidio.

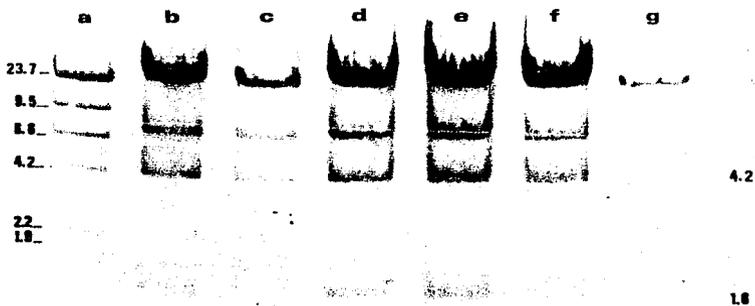


FIG.11.- Patrón de restricción del DNA de los seis fagos aislados a partir de placas generadas por uno de los fagos seleccionados por Benton-Davis que también da señal positiva en Southern. Obsérvese que el patrón es el mismo al de los dos fagos que hibridizan en la fig.10. a) Lambda HindIII como marcador de peso molecular.

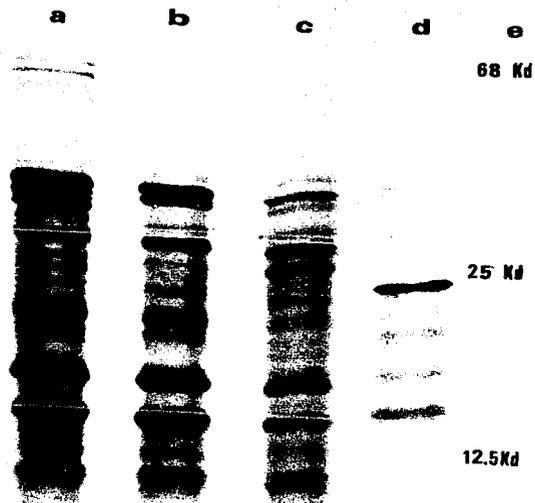


FIG.12.- Autorradiografía de la electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS de las proteínas, marcadas con azufre³⁵, del fago lambda PBC217 expresadas en maxicélulas. a y c) otros fagos recombinantes como control; b) fago vector lambda 1059; d) fago lambda PBC217 (GOGAT) y; e) marcadores de peso molecular.

que en ocasiones una banda muy tenue se hace presente. La falta de expresión de los genes puede deberse a las condiciones de crecimiento de la cepa MIS9, ya que es bien sabido que la GOGAT se sintetiza en condiciones de bajo amonio y los medios utilizados hasta ahora contienen gran cantidad de este compuesto. El variar las condiciones del medio de cultivo para la cepa productora de maxicelulas trae como consecuencia problemas tanto en el crecimiento celular como en la eficiencia del experimento.

El mapa de restricción del fago lambda PBC217 se realizó de manera parcial para las enzimas mostradas en la tabla 1. En ésta se pueden observar el número de sitios para cada enzima y su localización aproximada en pares de bases, lo que también se observa en la fig.13A. Los datos que muestran estos experimentos indican que la región que hibridiza está localizada de manera contigua al brazo derecho, ya que como se puede observar en la fig.13A, el fago aislado no tiene sitios de BamHI. Esto no concuerda con el resultado obtenido para DNA total donde las bandas de restricción que hibridizan son generadas por el corte en un sitio de BamHI (la fig.13B, muestra el modelo planteado para el corte en DNA total). El DNA del fago presenta el mismo patrón de restricción cuando es cortado solamente con la enzima BglII (fig.14), lo que indica que no se clonó dicho sitio de BamHI del genoma de S. typhi y por coincidencia el fago lleva un sitio de BglII en el brazo derecho a 1020pb del sitio de clonación. Este resultado fue el principal fundamento para apoyar la idea de que alguno de los genes de GOGAT en el lambda PBC217 pudiera estar truncado en cualquiera de los dos extremos (5' o 3'). Esto es, si la orientación de los genes en el inserto va de izquierda a derecha, el gene de la subunidad chica pudie-

TABLA I.- Sitios de restricción del DNA del fago lambda PBC217 para cuatro enzimas diferentes y su localización aproximada.

ENZIMA	No.SITIOS	UBICACION APROX.
BglII	6	472,3006S,3161S, 3581S,3616S, 3686S.
Sall	2	2066S,2421S.
EcoRI	3	2166S,3321S, 4026S.
HindIII	3	2201S,3276S, 3946S.

*NOTA: El DNA del fago lambda PBC217 no contiene sitios para BamHI.

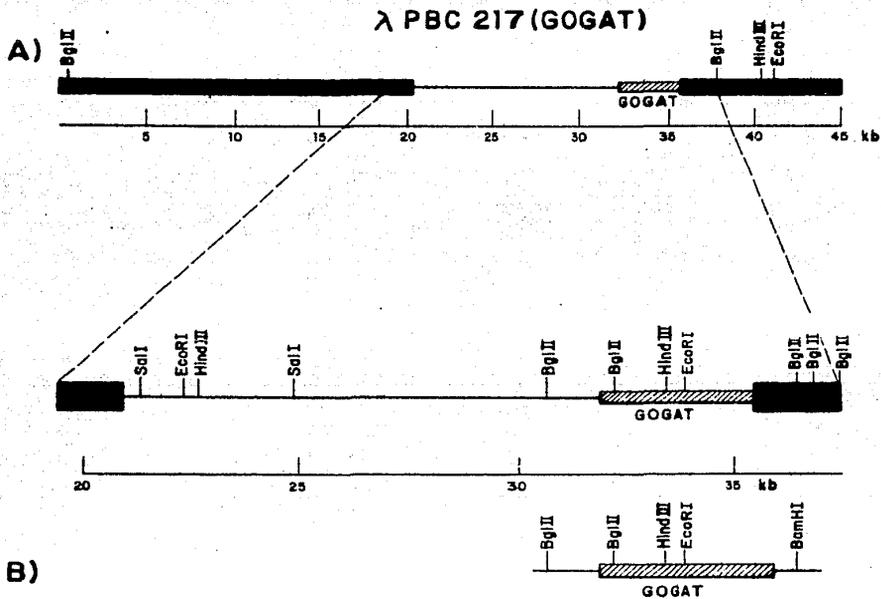


FIG.13.- A) Mapa de restricción parcial del fago lambda PBC217.
 B) Mapa de restricción parcial de la región del gene de GOGAT, en el genoma de S.typhi. Obsérvese que el sitio de BamHI es remplazado por el sitio de BglIII del brazo derecho del vector.

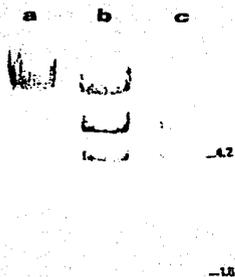


FIG.14.- Patrón de restricción del DNA del fago lambda PBC217, en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio, cortado con: a) BamHI; b) BamHI-BglII y; c) BglII. Observese que el patrón es el mismo en el carril b y c y que no hubo corte en el carril a.

ra estar truncando en el sitio de clonación y por tanto producir la banda proteica de 25Kd en las maxicélulas. Si la dirección es al contrario, entonces se puede pensar que lo que esta truncado es el extremo 5' del gene de la subunidad grande y por tanto no se ve su expresión; y que la proteína de la subunidad chica tiene un tamaño menor al reportado para otras enterobacterias.

Las bandas generadas por otras enzimas de restricción en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se observan en la fig.15, donde también se muestra la autorradiografía, resultado de la hibridización de estos patrones de restricción contra los fragmentos del pRSP20 mencionados anteriormente. La información surgida de estos experimentos fue utilizada para diseñar el mapa de la fig.13.

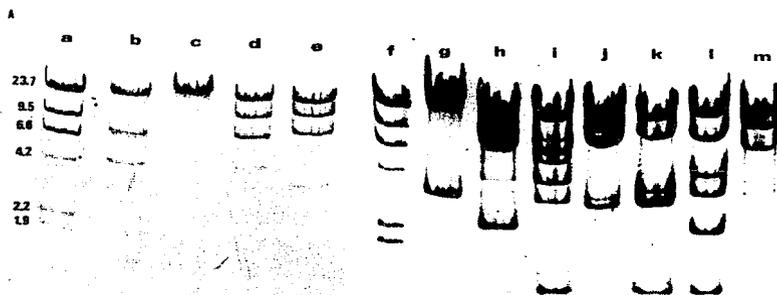


FIG.15.- Análisis del DNA del fago lambda PBC217 con diferentes enzimas de restricción.

A) Patrón de restricción en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio del DNA cortado con: a) DNA de lambda cortado con HindIII como marcador de peso molecular; b) BglII; c) BamHI; d) HindIII; e) EcoRI; f) lambda HindIII; g) Sall; h) HindIII-Sall; i) BglII-Sall; j) EcoRI-Sall; k) BglII-EcoRI; l) BglII-HindIII y; m) EcoRI-HindIII.



B) Autoradiografía de la hibridación de los patrones de restricción de la fig.15A, contra los fragmentos del pRSP20, señalados en el texto, marcados radioactivamente.

AISLAMIENTO DEL FAGO LAMBDA LPC1 (phoE)

Para rastrear el gene phoE de S.typhi se utilizó como detector heterólogo de hibridización el plásmido pJP14 que esta contenido en la cepa CE1222 y que fue donado por el grupo del Dr. J.Tommassen de la Universidad Estatal de Utrecht de Holanda. Este plásmido porta un fragmento de DNA de 4.9Kb, el cual contiene completo el gene phoE de E.coli, clonado en el plásmido vector pACYC184, fig.16. (114).

DNA de S.typhi de alto peso molecular fue digerido con dos enzimas de restricción diferentes, PstI y EcoRI. Estos DNA'S fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa al 1% y transferidos a membranas tipo "Gene Screen" según Southern (105). La hibridización de este filtro se realizó en condiciones muy relajadas, a 42°C con 30% formamida durante 12 horas, utilizando como detector el plásmido pJP14 marcado con fósforo 32. El lavado de los filtros también fue poco severo utilizando SSC 1X y SDS al 0.1%. La fig.17 muestra la autorradiografía de este ensayo, en la cual se puede observar que la digestión con PstI (carril a) genera un patrón de bandas de no muy alto peso molecular, al cual pueda ser fácilmente identificado en otros experimentos de hibridización. En cambio, la digestión con EcoRI (carril b) muestra bandas más grandes lo que haría poco eficiente seguir este patrón en los siguientes experimentos.

A partir del banco de DNA de S.typhi, construido en el laboratorio en el vector de clonación lambda 1059 (fig.5), se aisló un fago recombinante el cual porta una secuencia que comparte homologías considerables con el gene phoE de E.coli.

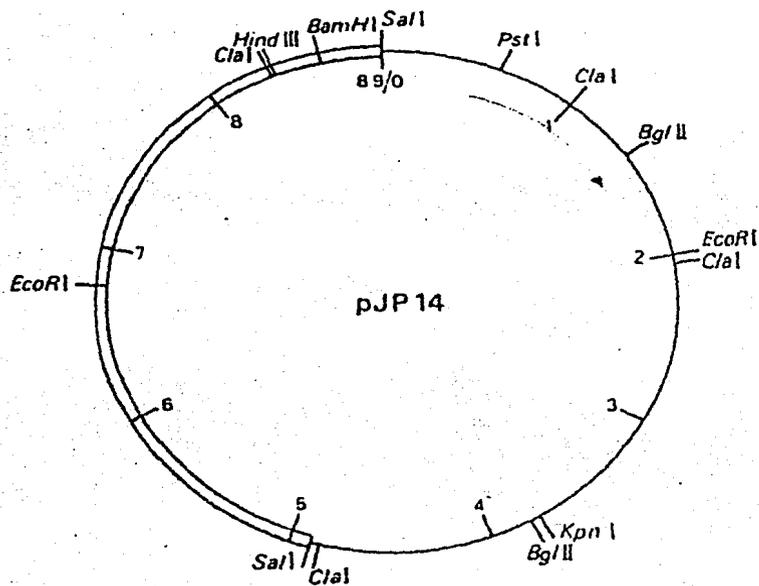


FIG.16.- Plásmido pJP14 en el que se encuentra clonado el gene para la PHE Pho E.

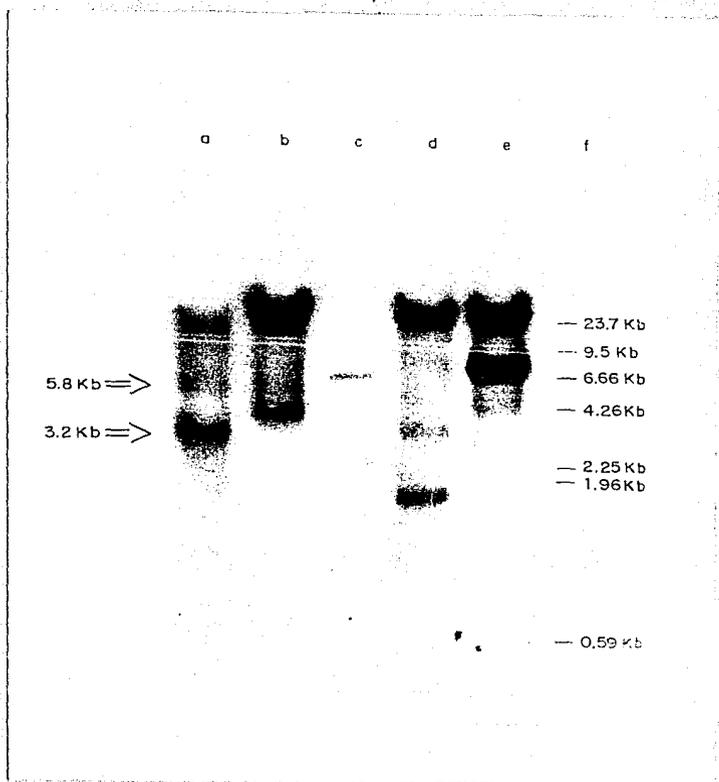


FIG.17.- Hibridización tipo Southern de DNA total de *S.typhi* y *E.coli* contra el plásmido pJP14 marcado radioactivamente. DNA de *S.typhi*: a) PstI y b) EcoRI; DNA de *E.coli*: d) PstI y e) EcoRI; c) pJP14 cortado con BglII como control positivo de hibridización.

Los experimentos iniciales indicaron que el fago en cuestión era poco competitivo, esto es, su propagación era poco eficiente con respecto a otros, cuando estos eran amplificadas juntos en líquido infectando la cepa Q359. Por este motivo, cerca de 2000 fagos recombinantes diferentes, producto de eventos primarios de empacamiento y que representan en más de 6 veces el genoma de S.typhi, se crecieron sobre un césped de células de la cepa Q359. Las placas de lisis, generadas por estos fagos, fueron replicadas una a una sobre un nuevo césped pero en agrupaciones de 24 fagos cada una. Ello se hizo en cajas de Petri de 8.5cm de diámetro conteniendo bactotripton-agar, hasta tener 80 agrupaciones aproximadamente. De este modo, cada fago recombinante crece de manera independiente en cada placa de lisis, sin que su propagación se vea afectada por la competencia con fagos más sanos.

Con el banco subdividido de esta manera, se formaron seis agrupaciones cada una con 144 fagos diferentes (esto es, se agrupó el contenido de 6 grupos de 24 fagos) para trabajar con un total de 864 fagos. Estos representan aproximadamente 3 veces el genoma de S.typhi. Después de amplificarlos en líquido, se extrajo DNA de cada agrupación (ver métodos) y se cortó con la endonucleasa de restricción PstI, de la cual ya conocíamos el patrón de restricción para DNA total. Hibridizando bajo las mismas condiciones que en el experimento con DNA total y con las mismas condiciones de lavado, el filtro se expuso a película de rayos X durante 16 horas. La fig.18 nos muestra el resultado donde se puede observar que el patrón de bandas esperado se encuentra en la agrupación número 5 (carril e). El bandeo inespecífico generado por la hibridización entre vectores fue identificado de la misma manera que para el gene gltB (datos no mostrados). Después de este experimento, el

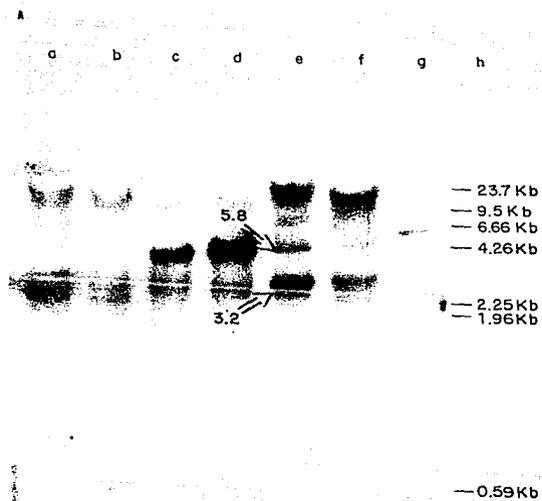
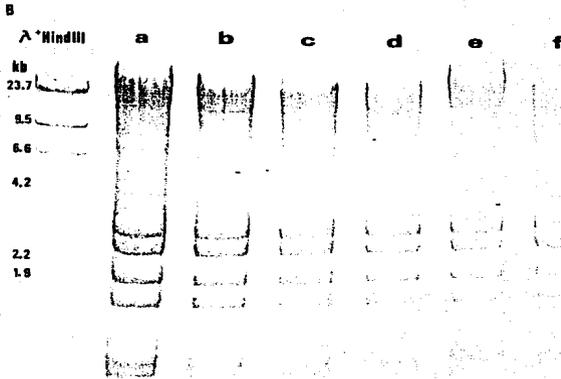


FIG.18.- A) Hibridización del DNA de 864 fagos diferentes contra el plásmido pJP14 marcado radioactivamente. Cada carril representa 144 fagos diferentes.



B) Patrón de restricción, generado por la enzima PstI en el DNA de las seis agrupaciones, analizado por electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. Las bandas constantes pertenecen al vector.

fago recombinante de interés había sido delimitado a 144 fagos, los cuales estaban divididos en seis grupos de veinticuatro fagos cada uno, debido a la estrategia seguida inicialmente para el manejo del banco.

Con este dato cada agrupación de veinticuatro fagos fue tratada bajo las mismas condiciones que en el experimento anterior y nuevamente los DNA'S de cada agrupación hibridizados contra el pJP14. El resultado se observa en la fig.19 donde la agrupación 6 (carril f) presenta la banda de 3.2Kb que ha servido de señal para rastrear la clona; en esta figura también se observa la banda de 5.8Kb la cual había sido detectada en la hibridización contra DNA total.

Gracias a que las agrupaciones utilizadas para el experimento anterior correspondían cada una a cajas que contenían veinticuatro clones aisladas, esto nos permitió tomar la agrupación que había dado la señal buscada para picar del agar las placas por separado y meterlas en tubos eppendorff de 1.5ml conteniendo 1ml de SH, que es un medio de elución para los fagos, hasta tener un total de veinticuatro tubos. Uno de estos constituía la clona de interés por lo que se formaron seis agrupaciones de cuatro fagos cada una para delimitar a solo cuatro la clona deseada. Nuevamente se extrajo DNA de cada agrupación, y posterior a su corte con PstI y la transferencia al filtro, la nueva hibridización indicó la presencia del fago en el grupo 1 (carril a) como se muestra en la fig.20. Este resultado nos dejó solo cuatro clones, y el análisis de su DNA por hibridización señaló la clona que porta el gene phoE de S.typhi, fig.21 (carril e). Cabe señalar que el detector utilizado para este experimento final no fue el plásmido pJP14 completo sino un fragmento de restricción de SalI-BglII de 1.4Kb que forma parte del inserto clonado en este plásmido y el cual contiene

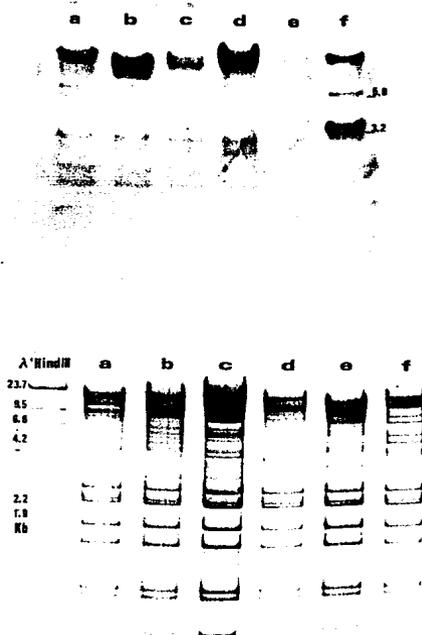


FIG.19.- A) Hibridización del DNA de 144 fagos diferentes contra el plásmido pJP14. Cada carril representa 24 fagos diferentes.

B) Patrón de restricción, generado por la enzima PstI en el DNA de las seis agrupaciones, analizado por electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

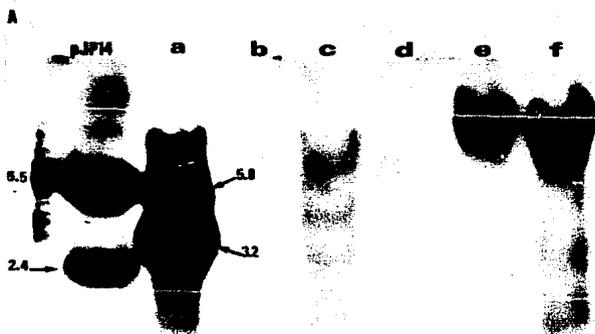
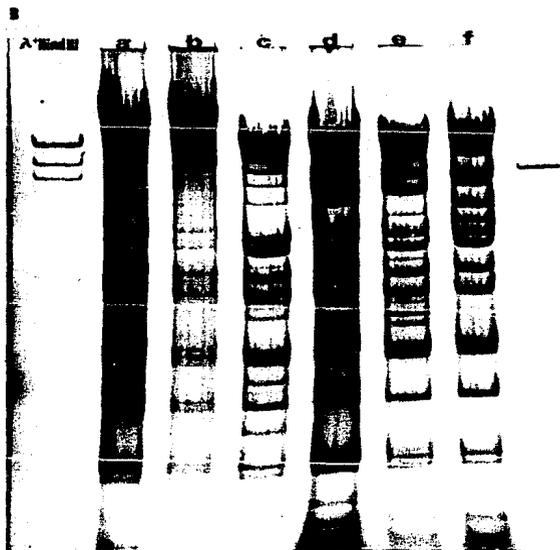


FIG.20.- A) Hibridización del DNA de 24 fagos diferentes contra el plásmido pJP14. Cada carril representa 4 fagos diferentes



B) Patrón de restricción, generado por la enzima PstI en el DNA de las seis agrupaciones, analizado por electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

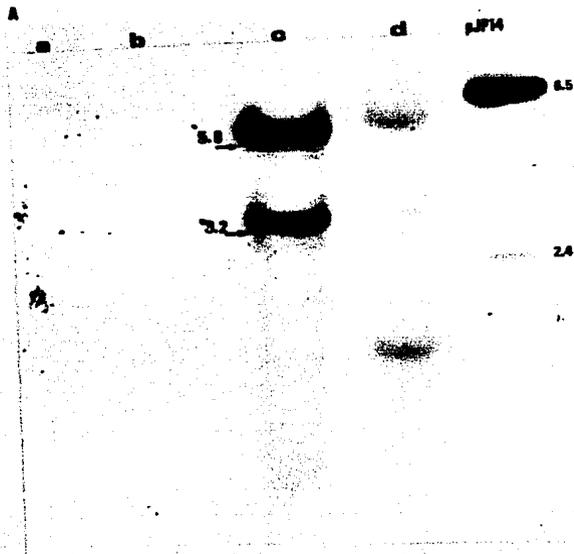
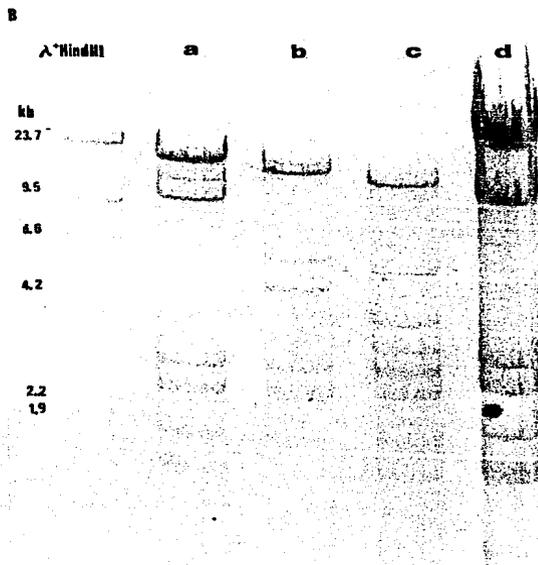


FIG.21.- A) Hibridización del DNA de cuatro fagos diferentes contra un fragmento de 1.4Kb del pJP14 (ver texto), que porta casi en su totalidad el gene phoE de E.coli. Cada carril representa un fago.



B). Patrón de restricción generado por la enzima PstI en el DNA de los cuatro fagos aislados, analizado por electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. Obsérvese que el carril c da el bandeado seguido durante todos los experimentos.

casi únicamente al gene phoE de E.coli, fig.16. Este fragmento se purifico a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión (ver metodos). Ello con el fin de que la hibridización se hiciera aún más específica, esto es, para que se evitara la hibridización entre las regiones homólogas de los vectores y de esta manera comprobar con más seguridad que nuestra clona contenía una secuencia homóloga al gene phoE de E.coli. Como se puede observar en la fig.21, la intensidad de la hibridización se aumenta para la banda de 5.8Kb, en vez de la banda de 3.2Kb, la cual se había estado utilizando como señal en las hibridizaciones. Esto indica que la mayor parte del gene esta contenido en la banda mayor o que esta región es la más homóloga entre los dos genes. Este último experimento se realizó bajo condiciones más severas de hibridización, ya que la formamida fue utilizada al 50%, con el propósito de solo permitir la formación de heteroduplex muy homólogos. La aparición de una tercera banda de hibridización en el fago aislado, más tenue que las otras dos, puede deberse a que regiones aledañas al gene conservan también cierta homología. Todas las autorradiografías presentadas hasta ahora muestran el bandeo generado por la enzima de restricción utilizada en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio; en estas figuras se observa el enriquecimiento de ciertas bandas generadas por los insertos clonados. Las bandas constantes pertenecen al vector de clonación.

La clona aislada de la manera descrita anteriormente, fue plaqueada a baja densidad y de aquí cinco placas al azar se escogieron para determinar, mediante el patrón electroforético de restricción, si todos correspondían al de la clona aislada; con el propósito de cerciorarnos de que nuestro fago no estuviera contaminado con otro. Como se puede observar en la fig.22 las placas muestreadas al azar presentan las

mismas bandas de restricción para la enzima PstI.

Con la clona aislada y checada se procedio a su purificación a través de un gradiente de cloruro de cesio y posterior a la diálisis estos fagos fueron utilizados para el estudio de la síntesis de proteínas de novo mediante maxicélulas (ver metodos). Estos experimentos son difíciles de llevar a cabo, ya que los antecedentes nos indicaban que la proteína Pho E solo se expresa en condiciones de limitación de fosfato y los primeros intentos por crecer a las maxicélulas (cepa H159) en medios de cultivo sin fosfato o con bajas concentraciones de éste (10-100mM), no dieron buenos resultados ya que la cepa presentó problemas serios de crecimiento. Por tanto, la infección y el marcaje con metionina-azufre-35 de las proteínas sintetizadas de novo fué muy ineficiente. En los últimos experimentos con células crecidas en medio normal se puede detectar la expresión, tal vez basal ya que la banda solo se observa tras varios días de exposición del gel a la película de rayos X, de una proteína que migra con un peso molecular aparente de 45Kd (fig.23, carril a). Esto hace pensar en la posibilidad de que se trate de la proteína Pho E de S.typhi; ya que para la de E.coli está reportado un peso molecular aparente muy similar.

El DNA de la clona aislada da un patrón de restricción de varias bandas para la enzima PstI. De éstas, tres son las que hibridizan. Con el fin de tratar de caracterizar una sola banda donde estuviera contenido el gene phoE de S.typhi completo, se realizó parcialmente el mapa de restricción del fago lambda LPC1 para las enzimas mostradas en la tabla II. En la fig.24 se muestra la localización aproximada de los sitios para cada una de estas enzimas, así como la situación aparente del gene dentro del inserto. Con estos cortes, se realizaron hibridiza-



FIG.22.- Electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio del DNA cortado con PstI de cinco fagos aislados al azar de placas generadas por el fago que dio señal positiva en el experimento anterior. Obsérvese que todos los patrones son homogéneos.

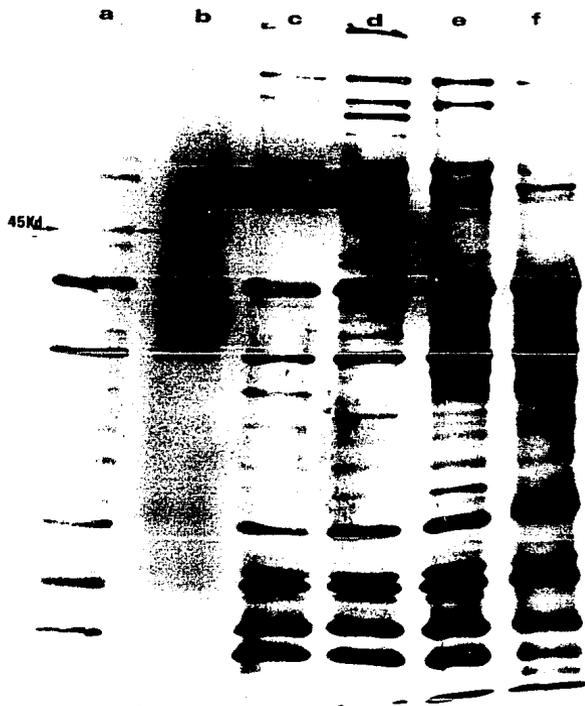


FIG.23.- Perfil proteico en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas del fago lambda LPI producidas en maxicélulas, marcadas con azufre³⁵. La figura muestra la autoradiografía del gel: a) fago lambda LPI (phoE); c) fago vector lambda 1059; d-f) otros fagos recombinantes como control.

TABLA II.- Sitios de restricción del DNA del fago lambda LPC1 para seis enzimas diferentes y su localización aproximada.

ENZIMA	No.SITIOS	UBICACION APROX.
BglII	6	472,29770,33065, 36765,37165, 37815.
EcoRI	3	24315,27315, 41219.
HindIII	4	25015,25865, 26865,40347.
BamHI	1	35465.
SphI	4	02124,12000, 29165,38300.
SmaI	5	19465,29915, 33815,34715, 38607.
ClaI	9	**

*NOTA: El DNA del fago lambda LPC1 no contiene sitios para Sall, XhaI y XbaI.

** La localización de estos sitios no ha sido determinada.

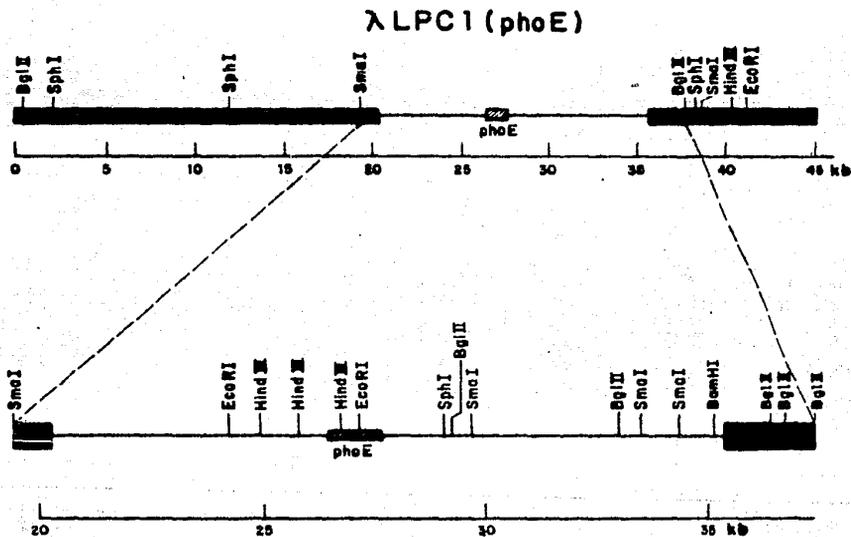


FIG.24.- Mapa de restricción parcial del fago lambda LPC1.

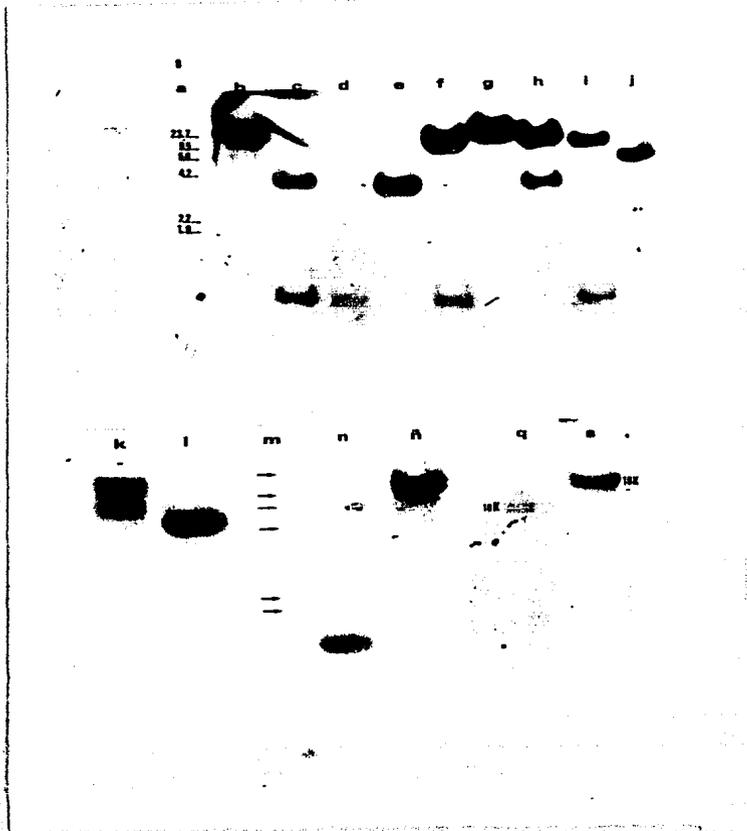
ciones contra el gene phoF de E.coli marcado con fosforo 32, de tal manera que caracterizaramos las bandas que contenian el gene en S.typhi. La fig.25 muestra cada una de estas hibridizaciones con las cuales se generó el modelo presentado en la fig.24.

Con estos resultados pudimos determinar que el gene está contenido en una banda de restricción generada por la enzima ClaI de 6,000pb, en otra producida por SmaI de 10,400pb y en una de SphI de 16,000pb. Cabe señalar que la situación de los sitios de restricción para enzimas como PstI, con la cual se aislo el fago y ClaI, no se muestran en la fig.24 debido a que para el fago vector lambda 1059 hay varios sitios y no se conoce su localización con certeza, lo cual dificulta la identificación de las bandas correspondientes al inserto.



FIG.25.- Análisis del fago lambda LPCI con diferentes enzimas de restricción.

A) Patrón de restricción en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio: a, m, r y t) lambda HindIII como marcador de peso molecular; b) BglII; c) HindIII-BglII; d) HindIII-BamHI; e) EcoRI-BglII; f) HindIII; g) Sall; h) Sall-EcoRI; i) Sall-HindIII; j) pJP14/BglII como control positivo de hibridización; k) Ball; l) ClaI; n) EcoRV; n) PvuII; o) XhoI; p) XbaI; q) SmaI; s) SphI.



B) Hibridización tipo Southern de las digestiones anteriores contra el fragmento de 1.4Kb del pJP14 que porta el gene phoE de E.coli.

DISCUSION Y CONCLUSION

El presente trabajo describe la localización y el aislamiento de los fagos recombinantes lambda LPC1 y lambda PBC217, los cuales contienen los genes phoE y gltB de S.typhi, respectivamente.

La estrategia seguida en el desarrollo de este trabajo nos indica como un banco de genes, construido en vectores derivados del bacteriófago lambda, en este caso el lambda 1059 (57), tiene la versatilidad de ser manejado de diferentes modos según las características de los resultados que se desean obtener.

En el caso especial de este trabajo, el fago que contiene el gene gltB de S.typhi se empezó a localizar mediante la formación de agrupaciones de fagos y extracción de DNA para transferencias tipo Southern. Sin embargo, basados en la alta intensidad de las primeras hibridizaciones (fig.7), se decidió utilizar la hibridización en placa, descrita por Benton y Davis (5), esperando una señal diferencial sobre todos los falsos positivos encontrados en la placa de autorradiografía. La técnica descrita por Benton y Davis, es de gran utilidad para el aislamiento de genes a partir de un banco de fagos, sobre todo cuando las sondas utilizadas no son genes aislados de la especie de la cepa receptora de los fagos. En caso contrario se obtienen gran cantidad de señales falsas, por la hibridización entre el detector y el DNA de la cepa que se infecta con el fago utilizado. El resultado de este intento fue satisfactorio ya que había un cociente alto de señal a ruido (fig.9). Esta técnica no se aplicó al aislamiento del gene phoE, ya que las primeras hibridizaciones no daban una intensidad suficiente como para suponer resultados parecidos a los del aislamiento del fago lambda PBC217. De esta manera, la metodología utilizada se basó en la forma-

74

ción consecutiva de agrupaciones de fagos recombinantes diferentes cada vez de menor número, a partir del grupo que presentara hibridización con el gene phoE de E.coli. El desarrollo de este mecanismo nos llevo a la conclusión de que cuando se buscaba una clona con viabilidad menor a la de los demás fagos, esto es, que su crecimiento fuera más lento que el de la mayoría, la subdivisión por dilución del grupo donde se encontrara el fago, traería como consecuencia la pérdida de éste, por no ser un fago competitivo. Con el propósito de contender con este problema, se diseñó en el laboratorio una estrategia la cual permite de manera potencial el aislamiento de cualquier gene que haya sido clonado y que exista en el banco. Esta metodología se describe brevemente en este trabajo y ha sido utilizada en nuestro laboratorio con resultados satisfactorios; uno de los cuales fue el del aislamiento del fago lambda LPC1 el cual contiene el gene phoE de S.typhi.

Las principales evidencias que indican que los genes contenidos en los fagos aislados lambda LPC1 y lambda PBC217 son phoE y gltB, respectivamente, nos la dan fundamentalmente su homología con los genes de E.coli, ya que los últimos experimentos de hibridización se realizaron en condiciones severas (50% formamida a 42° C). Además, los últimos experimentos se desarrollaron utilizando como detectores fragmentos de BNA que sólo contienen parte del gene estructural de gltB o de phoE de E.coli, sin contener más BNA de esta bacteria o parte del vector en el que se encontraban clonados. Para realizar lo anterior, fueron semipurificados, a partir de agarosa de bajo punto de fusión (ver metodos), diversos fragmentos del pRSP20 (26), plásmido que contiene los genes de gogat de E.coli. Así se purificó un fragmento de EcoRI a EcoRI de 800pb que forma parte de la subunidad chica; el que va del sitio de PstI al de BglII de 3,000pb que es casi en su totalidad el gene de la subunidad

grande (fig.6); y el fragmento del pJP14 (114) de 1,400pb que va del sitio de Sall al de BglII, el cual contiene casi completo el gene phoE de E.coli (fig.16). Estos experimentos siguieron dando el mismo patrón que el observado en las primeras hibridizaciones en las que se utilizaron los plásmidos completos. Esto corrobora que existe una gran homología entre los genes estructurales, como lo supone su cercanía en la escala filogenética, ya que ambas son miembros de la familia Enterobacteriaceae.

El estudio de la expresión de estos genes en maxicélulas no aportó datos concluyentes. Para gltB sólo se observa con claridad una banda que podría corresponder a la subunidad chica de gogat o a parte de esta, y para phoE en ocasiones la expresión limitada de un polipeptido que, por el peso molecular aparente, podría corresponder a Pho E. Sin embargo, no debemos dejar de tomar en cuenta que su estudio no termina aquí y que su expresión debe ser estudiada en sistemas donde sea factible manipular las condiciones, como la limitación de amonio y de fosfato, respectivamente, las cuales no fue posible variar para el sistema de maxicélulas. De esta manera, estamos en la etapa de subclonar ambos genes en plásmidos, donde la expresión puede ser analizada en minicélulas o realizar estudios de complementación: en la cepa mutante PA340 para gogat; o para PhoE analizar su expresión en preparaciones de ME de mutantes de E.coli que carezcan de esta proteína.

En los resultados se ha mencionado que, según datos preliminares por mapeo de restricción, el gene phoE parece estar completo en el incerto del lambda LPC1. Sin embargo, el gene gltB parece estar truncado hacia alguno de los extremos. En este sentido también se inician los estudios necesarios para comprobar este dato. Si esto fuera cierto

tenemos en nuestras manos una parte del gene que puede ser utilizado como detector totalmente homologa para el aislamiento completo de este gene, ya sea a partir del mismo banco o utilizando un banco de DNA construido en plásmidos con fragmentos de restriccion que por hibridación tipo Southern se haya determinado que contienen todo el gene en un solo segmento.

La utilidad del aislamiento del gene gltB de S.typhi ayudara, mediante la deducción de su secuencia y de su expresion en E.coli, a entender más acerca del metabolismo nitrogenado en procariontes. Además, la comparación de este gene con el de E.coli y otros organismos a nivel de secuencia nucleotidica y de aminoácidos, proporcionará datos a nivel evolutivo que ayudaran a determinar que tanto se ha conservado este gene.

Los resultados aqui obtenidos, si bien no son concluyentes, si nos permitieron abrir el camino para obtener los primeros conocimientos sobre la biología molecular de un organismo patogeno como S.typhi, y a su vez, adquirir la experiencia necesaria para el manejo de una serie de metodologías que ayudaron a tener un buen aprovechamiento del banco de DNA construido en el fago lambda 1059.

Este antecedente sienta las bases para el inicio de una serie de investigaciones que tengan como meta el generar conocimientos que tiendan a la solución de uno de los principales problemas de salud en nuestro país. Se estima que la fiebre tifoidea es padecida al ano por una de cada 100,000 personas (31), lo cual produce cuantiosas perdidas en cuanto a horas-hombre de trabajo y puede producir la muerte en el 1% de los casos. De aqui que el aislamiento del gene phoE de S.typhi y de otros genes para PNE, (resultados también obtenidos en nuestro laboratorio) tenga relevancia en el área de la salud; sobre todo porque se

están realizando estudios con las PNE con miras al desarrollo de sistemas de diagnóstico rápidos y confiables, y de posibles vacunas para la prevención de esta enfermedad.

Es por lo anterior que se tiene gran interés en conocer la estructura molecular de estas proteínas en S.typhi a través de sus genes. Mediante la comparación a este nivel con las PNE de otras enterobacterias, sería interesante definir si existen zonas variables entre las proteínas de las diferentes especies, sobre todo en la región que se encuentra expuesta al medio, donde los epitopes pueden estar variando de una bacteria a otra, como parece indicarlo la comparación de la secuencia de la proteína Omp A en tres diferentes enterobacterias. También de este modo establecer si la proteína en conjunto puede ser reconocida de manera específica por anticuerpos originados por el paciente, aun sobre un fondo de respuesta inmune generada en contra de otros organismos.

Varios estudios se han realizado tanto en el campo del diagnóstico como en el de la prevención. Sin embargo, el diagnóstico en la actualidad no es completamente confiable ni muy ágil, y las técnicas más acertadas resultan ser muy agresivas y toman demasiado tiempo (31). Por otra parte, el desarrollo de vacunas ha representado serios problemas para los grupos que a esto se han avocado, donde el mayor acercamiento lo representa una vacuna viva desarrollada por Germanier, et al., (42), de la cual aún no se establece con certeza su eficacia.

Las PNE se han seleccionado como posibles candidatos para estudiarlas en este campo principalmente por dos factores: la presencia de asas de la proteína en la parte expuesta de la bacteria (hecho que se ve favorecido por la estructura de hoja beta plegada) y el gran número

de copias que cada una de ellas presenta en vivo. El estudio de sus genes no solo ayudará a comprender si estos se comportan de similar manera a las generalidades observadas en procariontes, sino a determinar que tan diferentes son a los genes de estas proteínas en otras enterobacterias y que tan buenos inmunogenos son en el organismo humano.

De este modo queda abierta la posible utilización de alguna o algunas de estas proteínas para el desarrollo de un buen sistema de diagnóstico o como componentes de una vacuna, y su importancia en este aspecto será conocida con el desarrollo de futuras investigaciones, donde también la utilización de DNA como detector de infección empieza a tener actualidad en el campo de la salud. Es así como el estudio de este microorganismo resulta ser de gran importancia ya que también se plantean posibilidades de estudiar con más detalle algunos otros aspectos del proceso patógeno de esta bacteria, ya que su relevancia como agente infeccioso estriba en su invasividad y en su resistencia a la degradación por macrófagos.

- 27.-DAIRI, T., K. INOKUCHI, T. MIZUNO y S. MIZUSHIMA. 1985. "Positive control of transcription initiation in *Escherichia coli*. A base substitution at the Pribnow box renders ompF expression independent of a positive regulator". J. MOL. BIOL. 184:1-6
- 28.-DATTA, D.B., B. ARDEN y U. HENNING. 1977. "Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors". J. BACTERIOL. 131:821-829.
- 29.-DAVIS, D.B., R. DULBECCO, H.M. EISEN y H.S. GINSBERG. 1980. "Microbiology". 3era. Ed. Harper International Ed. 1355pp.
- 30.-DIRIENZO, J.M., K. HAKANURA y M. INOUE. 1978. "The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions". ANN. REV. BIOCHEM. 47:481-532.
- 31.-EDELMAN, R. y M.H. LEVINE. 1986. "Summary of an international workshop on typhoid fever". REV. INFECT. DIS. 8:329-349.
- 32.-ENDERMAN, R., C. KRAMER y U. HENNING. 1978. "Major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12: evidence for protein II being a transmembrane protein". FEBS LETT. 86:21-24.
- 33.-ENGEL, A., A. MASSALSKI, H. SCHINDLER, D.L. DORSET y J.P. ROSENBUSCH. 1985. "Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes". NATURE. 137:643-645.
- 34.-FEISS, M., R.A. FISHER, M.A. CRAYTON y C. EGNER. 1977. "Packaging of the bacteriophage lambda chromosome: effect of the chromosome length". VIROLOGY. 77:281-285.
- 35.-FOSTER, J.W. y M.P. SPECTOR. 1986. "Phosphate starvation regulation of *Salmonella typhimurium*". J. BACTERIOL. 166:666-669.
- 36.-FOULDS, J., y T.J. CHAI 1978. "New major outer membrane protein found in an *Escherichia coli* tolF mutant resistant to bacteriophage Tu1b". J. BACTERIOL. 133:1478-1483.
- 37.-FREUDL, R. y S.T. COLE. 1983. "Cloning and molecular characterization of the ompA gene from *Salmonella typhimurium*". EUR. J. BIOCHEM. 134:497-502.
- 38.-FRIEDMAN, D. y M. GOTTESMAN. 1983. "En: Lambda II". (Ed. Hendrix, R.W., Roberts, J.W., F.W. Stahl y R.A. Weisberg). "COLD SPRING HARBOR LAB.
- 39.-FUCHS, R.L., M.J. MADONNA y J.E. BRENCHELEY. 1982. "Identification of the structural genes for glutamate synthase and genetic characterization of this region of the *Salmonella typhimurium* chromosome". J. BACTERIOL. 149:906-915.
- 40.-GAMON, K., R. CHEN y U. HENNING. 1978. "Major proteins of outer cell envelope membrane of *Escherichia coli* K12: multiple species of protein I differ in primary structure". MOL. GEN. GENET. 166:187-192

- 41.-GARCIAARRUBIO, A., E. LOZOYA, A. COVARRUBIAS y F. BOLIVAR. 1983. "Structure organization of the genes that encode two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli*". GENE. 26:165-170.
- 42.-GERMANIER, R. y E. FUREK. 1975. "Isolation and characterization of gal E mutant Ty21A of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine". J. INFECT. DIS. 131:553-558.
- 43.-GUAN, C.B., B. VANNER y H. INOUE. 1983. "Analysis of regulation of *phoB* expression using a *phoB-cat* fusion". J. BACTERIOL. 156:710-717.
- 44.-HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1979. "Transcriptional regulation of *Escherichia coli* K12 major outer membrane protein 1b". J. BACTERIOL. 140:324-330.
- 45.-HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1981. "The *ompB* locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12. J. MOL. BIOL. 146:23-43.
- 46.-HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1981. "Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K12". J. MOL. BIOL. 151:1-15.
- 47.-HALL, M.N. y T.J. SILHAVY. 1981. "Genetic analysis of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli*". ANN. REV. GENET. 15:91-142.
- 48.-HANCOCK, R.E.W., G.H. DECAD y H. WAKAIDO. 1979. "Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aureoginosa* PA01". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 554:323-331
- 49.-HANCOCK, R.E.W., K. POOLE y R. BENZ. 1982. "Outer membrane protein P of *Pseudomonas aureoginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes". J. BACTERIOL. 150:730-738
- 50.-HENNING, U., W. SCHMIDMAYR y I. HINDENNACH. 1977 "Major proteins of the outer cell envelope membrane of *Escherichia coli* K12: multiple species of protein I". MOL. GEN. GENET. 154:293-298
- 51.-HENNING, U., H.D. ROYER, R.M. TEATHER, I. HINDENNACH y C.P. HOLLENBERG. 1979. "Cloning of the structural gene (*ompA*) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K12". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 76:4360-4364.
- 52.-HERNANDEZ, R., A. ISIBASI, V. ORTIZ y J. KUMATE. 1985. "Protection with *Salmonella typhi* outer membrane protein in mice". INFECT. IMM. (En prensa).
- 53.-HERSKOWITZ, I. y D. HAGEN. 1980. "Lysis-lisogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness". ANN. REV. GENET. 14:399-445.

54.-HINDAHL, M.S., G.W.K. CROCKFORD y R.E.U. HANCOCK. 1984. "Outer membrane protein Mmp C of *Escherichia coli*: pore forming properties in black lipid bilayers". J. BACTERIOL. 159:1053-1055.

55.-INOKUCHI, K., N. MUTOH, S. MATSUYAMA y S. MIZUSHIMA. 1982. "Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12". NUCLEIC ACID RESEARCH. 10:6957-6968.

56.-INOKUCHI, K., H. FURUKAWA, K. NAKAHURA y S. MIZUSHIMA. 1984. "Characterization by deletion mutagenesis in vitro of the promoter region of ompF, a positively regulated gene of *Escherichia coli*". J. MOL. BIOL. 178:653-668.

57.-KARN, J., S. BRENNER, L. BARNETT y G. CESARENI. 1980. "Novel bacteriophage lambda cloning vector". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 77:5172-5176.

58.-KAWAJI, H., T. HIZUHO y S. MIZUSHIMA. 1979. "Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K12". J. BACTERIOL. 140:843-847.

59.-KLEFFEL, B., R.M. GARAVITO, U. BAUMEISTER y J.P. ROSENBUSCH. 1985. "Secondary structure of a channel-forming protein: porin from *Escherichia coli* outer membranes". EMBO. JOURNAL. 4:1589-1592.

60.-KORTELAND, J., J. TOMHASSEN y B. LUGTENBERG. 1982. "Pho B protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 690:282-289.

61.-LABISCHINSKI, H., G. BARNICKEL, H. BRADACZEK, D. NAUMANN, E.T. RIETSCHNEL y P. GIESBRECHT. 1985. "High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane". J. BACTERIOL. 162:9-20.

62.-LAEMMLI, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". NATURE (London). 227:680-685.

63.-LEE, D.R. y C.A. SCHNATHAN. 1980. "Comparison of outer membrane porin proteins produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*". J. BACTERIOL. 142:1019-1022.

64.-LEE, R.L. C.A. SCHNATHAN y A.P. PUGSLEY. 1979 "Chemical heterogeneity of major outer membrane pore proteins of *Escherichia coli*". J. BACTERIOL. 138:861-870.

65.-LOZOYA, E., R. SANCHEZ-PESCADOR, A. COVARRUBIAS, I. VICHIDO y F. BOLIVAR. 1980. "Tight linkage of genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K12". J. BACTERIOL. 144:616-621.

66.-LUGTENBERG, B. y L. van ALPHEN. 1983. "Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 737:51-115.

67.-LUGTENBERG, B. 1981. "Composition and function of the outer membrane of Escherichia coli". TIBS. OCT:262-266.

68.-LUGTENBERG, B. y L. vanALPHEN. 1983. "Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other gram-negative bacteria". BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA 737:510-515.

69.-LUGTENBERG, B., R. VanBOXTEL, C. VERHOEF y U. VanALPHEN. 1978 "Pore protein e of the outer membrane of Escherichia coli K12". FEBS LETT. 96:99-105

70.-LUGTENBERG, B., H. BRONSTEIN, N. van SELM y R. PETERS. 1977. "Peptidoglycan-associated outer membrane protein in Gram-negative bacterial". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 465:571-578.

71.-MADONNA, H.J., R.L. FUCHS y J.E. BRECHLEY. 1985. "Fine structure analysis of Salmonella typhimurium Glutamate Synthase genes". J. BACTERIOL. 161:353-360.

72.-MAGOTA, K., N. OTSUJI, T. MIKI, T. HORIUCHI, S. TSUNASAWA, J. KONDO, F. SAKIYAMA, H. ANEMURA, T. MORITA, H. SHINAGAWA y A. NAKATA. 1984. "Nucleotide sequence of the phoS gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of Escherichia coli". J. BACTERIOL. 157:909-917.

73.-MAKINO, K., H. SHINAGAWA y A. NAKATA. 1984. "Cloning and characterization of the alkaline phosphatase positive regulatory gene (phoR) of Escherichia coli". MOL. GEN. GENET. 195:381-390.

74.-MAKINO, K., H. SHINAGAWA y A. NAKATA. 1985. "Regulation of the phosphate regulon of Escherichia coli K12: regulation and role of the regulatory gene phoR". J. MOL. BIOL. 184:231-240.

75.-MAKINO, K., H. SHINAGAWA, M. ANEMURA y A. NAKATA. 1986. "Nucleotide sequence of the phoB gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of Escherichia coli K12". J. MOL. BIOL. 190:37-44.

76.-MANIATIS, T., E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK. 1982. "Molecular cloning". A laboratory manual. COLD SPRING HARBOR LAB.

77.-MANTSALA, P. y H. ZALKIN. 1976. "Active subunits of Escherichia coli GOGAT". J. BACTERIOL. 126:539-541.

78.-MATSUYAMA, S. y S. NIZUSHIMA. 1985. "Construction and characterization of a deletion mutant lacking micF, a proposed regulatory gene for Omp F synthesis in Escherichia coli". J. BACTERIOL. 162:1196-1202.

79.-MIZUNO, T., H-Y. CHOU y M. INOUE. 1983. "A comparative study on the genes for three por ins of the Escherichia coli outer membrane: DNA sequence of the osmoregulated ompC gene". J. BIOL. CHEM. 258:6932-6940.

80.-MIZUNO, T., K.Y. CHOU y M. INOUE. 1983. "DNA sequence of the promoter region of the ompC gene and the aminoacid sequence of the signal peptide of pro-Omp C protein of Escherichia coli". FEBS LETT. 151:159-164.

81.-MIZUNO, T., E.T. WURTZEL y M. INOUE. 1982. "Cloning of the regulatory genes (ompR and envZ) for the matrix proteins of the Escherichia coli outer membrane". J. BACTERIOL. 150:1462-1466.

82.-MIZUNO, T., E.T. WURTZEL y M. INOUE. 1982. "Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the envZ gene of ompB operon of Escherichia coli and characterization of its gene product". J. BIOL. CHEM. 257:13962-13968

83.-MIZUNO, T., H-Y. CHOU y M. INOUE. 1984. "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micrRNA). PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 81:1966-1970.

84.-NOVVA, N.R., K. NAKANURA y M. INOUE. 1980. "Gene structure of the OmpA protein, a major surface protein of Escherichia coli required for cell-cell interaction". J. MOL. BIOL. 142:317-328.

85.-WAKAE, T. 1986. "Outer membrane permeability of bacteria". CRC. CRIT. REV. MICROBIOL. 13:1-62.

86.-WAKANURA, K y M. INOUE. 1979. "DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of Escherichia coli: an extremely AT-rich promoter". CELL. 18:1109-1117.

87.-WAKATA, A., M. AMEMURA y H. SHINAGAWA. 1984. "Regulation of the phosphate regulon in Escherichia coli K12: regulation of the negative regulatory gene phoU and identification of the gene product". J. BACTERIOL. 159:979-985.

88.-HARA, F., S.C. MATSUYAMA, T. MIZUNO y S. MIZUSHIMA. 1986. "Molecular analysis of mutant ompR genes exhibiting different phenotypes as to osmoregulation of the ompF and ompC genes of Escherichia coli". MOL. GEN. GENET. 202:194-199.

89.-NIKAIDO, H, y Y. ROSENBERG. 1983. "Porin channels in Escherichia coli: studies of liposomes reconstituted from purified proteins". J. BACTERIOL. 153:241-252.

90.-NIKAIDO, H. y T. WAKAE. 1979. "The outer membrane of gram-negative bacteria". ADV. MICROB. PHYSIOL. 20:163-250.

91.-NIKAIDO, H., y H.C.P. WU. 1984. "Aminoacid sequence homology among the major outer membrane proteins of Escherichia coli". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 81:1048-1052.

92.-NOGAMI, T.y S. MIZUSHIMA. 1983. "Outer membrane porins are important in maintenance of the surface structure of Escherichia coli cells". J. BACTERIOL. 156:402-408.

93.-OSBORN, M.J.y H.C.P. WU. 1980. "Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria". ANN. REV. MICROBIOL. 34:369-422.

94.-OVERBEEKE, N.,y B. LUGTENBERG. 1980. "Expression of outer membrane protein e of Escherichia coli K12 by phosphate limitation". FEBS LETT. 112:229-232.

95.-OVERBEEKE, N.,H. BERGMANS, F. VanHANSFELD y B. LUGTENBERG. 1983. "Complete nucleotide sequence of phoE, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of Escherichia coli K12". J. MOL. BIOL. 163:513-532.

96.-OVERBEEKE, N.,y B. LUGTENBERG. 1982. "Recognition site for phosphorus-containing compounds and other negatively charged solutes on the Pho E protein pore of the outer membrane of Escherichia coli". EUR. J. BIOCHEM. 126:113-118.

97.-OVERBEEKE, N., G. van SCHARRENBURG y B. LUGTENBERG. 1980. "Antigenic relationships between pore proteins of Escherichia coli K12". EUR. J. BIOCHEM. 110:247-254.

98.-PALVA, E.T. 1978. "Major outer membrane protein in Salmonella typhimurium induced by maltose". J. BACTERIOL. 136:286-294.

99.-PAUL, C., y J.P. ROSEMBUSCH. 1985. "Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin". ENBO JOURNAL. 4:1593-1597.

100.-PUGSLEY, A.P. y C.A. SCHNITMAN. 1978. "Identification of three genes controlling production of new outer membrane pore proteins in Escherichia coli K12". J. BACTERIOL. 135:1118-1129.

101.-PUGSLEY, A.P.,D.R. LEE y C.A. SCHNITMAN. 1980. "Genes affecting the major outer membrane proteins of Escherichia coli K12: mutations at nmpA and nmpB". MOL. GEN. GENET.177:681-690.

102.-RIGBY, P.U.J.,N. BIECKMANN, C. RHODES y P. BERG. 1977. "Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I". J. MOL. BIOL. 113:237-251.

103.-SHINAGAWA, H.,K. MAKINO y A. NAKATA. 1983. "Regulation of the pho regulon in Escherichia coli K12. Genetic and physiological regulation of the positive regulatory gene (phoB) expression". J. MOL. BIOL. 168:477-488.

104.-SONNTAG, I.,H. SCHWARZ, Y. HIROTA y U. HENNING. 1978. "Cell envelope and shape of Escherichia coli: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins". J. BACTERIOL. 136:280-285.

105.--SOUTHERN, E.H. 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". J. MOL. BIOL. 98:503-517.

106.--SURIN, B.P., D.A. JANS, A.L. FINNELL, D.C. SHAW, G.B. COX y H. ROSENBERG. 1984. "Structural gene for the phosphate-repressible phosphate-binding protein of *Escherichia coli* has its own promoter: complete nucleotide sequence of the *phoS* gene". J. BACTERIOL. 157:772-778.

107.--SURIN, B.P., H. ROSENBERG y G.B. COX. 1985. "Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships". J. BACTERIOL. 161:189-198.

108.--SUTCLIFFE, J., R. BLUMENTHAL, A. WALTER y J. FOULDS. 1983. "*Escherichia coli* outer membrane protein K is a porin". J. BACTERIOL. 156:867-872.

109.--SWANSTRON, R. y P.R. SHANK. 1978. "X-ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I ". ANAL. BIOCHEM. 86:184

110.--SZMELCMAN, S. y M. HOFMUNG. 1975. "Maltose transport in *Escherichia coli* K12: involvement of the bacteriophage lambda receptor". J. BACTERIOL. 124:112-118.

111.--TOKUNAGA, H., H. TOKUNAGA, Y. OKAJIMA y T. MAKAE. 1979. "Characterization of porins for the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. 2. Physical properties of the functional oligomeric aggregates". J. BACTERIOL. 136:286-294.

112.--TONNASSSEN, J., y B. LUGTENBERG. 1980. "Outer membrane protein e of *Escherichia coli* K12 is co-regulated with alkaline phosphatase". J. BACTERIOL. 143:151-157

113.--TONNASSSEN, J., y B. LUGTENBERG. 1981. "Localization of *phoE*, the structural gene for outer membrane protein e in *Escherichia coli* K12". J. BACTERIOL. 147:118-123.

114.--TONNASSSEN, J., P. OVERDUIN, B. LUGTENBERG y H. BERGMANS. 1982. "Cloning of *phoE*, the structural gene for the *Escherichia coli* phosphate limitation-inducible outer membrane pore protein". J. BACTERIOL. 149:668-672.

115.--TONNASSSEN, J., H. VANTOL y B. LUGTENBERG. 1983. "The ultimate localization of an outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 is not determined by the signal sequence". EMBO JOURNAL. 2:1275-1279.

116.--TONNASSSEN, J., y B. LUGTENBERG. 1984. "Amino terminus of outer membrane Pho E protein: localization by use of a *bla-phoE* hybrid gene". J. BACTERIOL. 157:327-329.

117.--TONNASSSEN, J., A.P. PUGSLEY, J. KORTELAND, J. VERBAKELAND y B. LUGTENBERG. 1984. "Gene encoding a hybrid Omp F-Pho E pore protein in the outer membrane of *Escherichia coli* K12". MOL. GEN. GENET. 197:503-508.

118.-TOMNASSEN, J., J. LEUNISSEN, M. vanDAMME-JONASTEN y P. OVERDUIN. 1985. "Failure of Escherichia coli K12 to transport Pho E-Lac Z hybrid proteins out of the cytoplasm". EMBO JOURNAL. 4:1041-1047.

119.-TOMNASSEN, J., P. vanderLEY, M. vanZEIJL y M. AGTERBERG. 1985. "Localization of functional domains in Escherichia coli K12 outer membrane porins". EMBO JOURNAL. 4:1583-1587.

120.-TOMNASSEN, J., P. vanderLEY, A. vanderENDE, H. BERGMANS y B. LUGTENBERG. 1982. "Cloning of ompF, the structural gene for an outer membrane pore protein of Escherichia coli K12: physical localization and homology with the phoE gene". MOL. GEN. GENET. 185:105-110.

121.-TOMNASSEN, J., P. de GEUS, B. LUGTENBERG, J. HACKETT y P. REEVES. 1982. "Regulation of pho regulon of Escherichia coli K12: cloning of the regulatory genes phoB and phoR and identification of their gene products". J. MOL. BIOL. 157:265-274.

122.-TYLER, B. 1978. "Regulation of the assimilation of nitrogen compounds". ANN. REV. BIOCHEM. 47:1127-1162.

123.-VERHOEF, C., C. vanKOPPEN, P. OVERDUIN, B. LUGTENBERG, J. KORTELAND y J. TOMNASSEN. 1984. "Cloning and expression in Escherichia coli K12 of the structural gene for outer membrane Pho E protein from Enterobacter cloacae". GENE. 32:107-115.

124.-VanALPHEN, L., L. HAVEKES y B. LUGTENBERG. 1977. "Major outer membrane protein d of Escherichia coli K12. Purification and in vitro activity of bacteriophage K3 and F plus mediated conjugation". FEBS LETT. 75:285-290.

125.-VanALPHEN, U. y B. LUGTENBERG. 1977. "Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of Escherichia coli". J. BACTERIOL. 131:623-630.

126.-VanALPHEN, U., N. VanSELM y B. LUGTENBERG. 1978. "Pores in the outer membrane of Escherichia coli K12. Involvement of proteins b and e in the functioning of pores for nucleotides". MOL. GEN. GENET. 159:75-83

127.-WHITFIELD, C., R. E. W. HANCOCK y J. U. COSTERTON. 1983. "Outer membrane protein K of Escherichia coli: purification and pore-forming properties in lipid bilayer membranes". J. BACTERIOL. 156:873-879.

128.-WOO, S. L. C. 1979. "En: Methods in Enzymology. (Ed. Wu, R.) ACADEMIC PRESS, New York. 68:389-395.

129.-WURTZEL, E. T. M. Y. CHOU y M. INOUE. 1982. "Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the ompR gene of the ompB operon of Escherichia coli and characterization of its gene product". J. BIOL. CHEM. 257:13685-13691

130.-YAHADA, N. y S. MIZUSHIMA. 1960. "Interaction between major outer membrane protein (O-B) and lipopolysaccharide in Escherichia coli K12". EUR. J. BIOCHEM. 103:209-218.