



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

I E T A C A L A

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

REPRESION CATABOLICA DE LA PRODUCCION DE LA
ENTEROTOXINA TERMOESTABLE DE Escherichia coli.

T E S I S

QUE PARA OBTENER

EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

DAVID SEGURA COBOS

TLALNEPANTLA, MEX.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el
Departamento de Genética y Biología
Molecular del Centro de Investigación
y Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional bajo la dirección
del Dr. Jacobo Kupersztoch Portnoy,
a quien agradezco su asesoría.

AGRADECIMIENTOS.

Por su asesoría y apoyo durante la realización del presente trabajo hago patente mi agradecimiento a las siguientes personas:

Dra. Heather Stieglitz

Q.F.B. Lourdes Cervantes

Biól. Rocío Fonseca Liñán

Q.F.B. Flora Estela Muñiz Lozano

Biól. Luz María Guzmán Verdusco

Biól. Jorge Nieto

Biól. Ramón Robledo Serna

Sr. René López Bolaños

Agradezco a la Compañía Avón Cosmetics, S. A. de C. V. el apoyo económico que me brindaron durante la realización de esta tesis.

A la M. en C. Beatriz Vázquez Cruz le agradezco su interés y el apoyo que me brindó durante la escritura de la versión final del presente trabajo.

Por sus sugerencias para el mejoramiento del presente escrito va mi agradecimiento al Biól. Agustín Ruiz Cabrera.

DEDICATORIA.

Por el apoyo, la confianza y el cariño que me brindan dedico
el presente trabajo a mis padres

Sra. Elisa Cobos de Segura

Sr. Daniel Segura Cerecedo

a mis hermanos

Ascensión

José Guadalupe

Imelda

Ignacio

Patricia

Sóstenes

Carlos

Guillermo

a mis familiares

a mis amigos

a Silvia

I N D I C E

Página

RESUMEN.

I.-	INTRODUCCION.....	1
1.-	PLASMIDOS BACTERIANOS.....	1
2.-	PLASMIDOS ENTEROTOXIGENICOS.....	3
3.-	REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA.....	6
a)	El complejo promotor-operador.....	6
b)	Señales de iniciación y terminación de la transcripción.....	7
c)	Represión catabólica.....	10
4.-	REPRESION CATABOLICA DE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA ST.....	11
Esquema 1.-	Plásmidos ST.....	14
II.-	MATERIAL Y METODOS.....	15
1.-	CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	15
2.-	MEDIOS DE CULTIVO.....	16
3.-	AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDOS.....	16
a)	Preparación de lisados claros.....	16
b)	Gradientes de CsCl-bromuro de etidio.....	17
c)	Concentración de la solución de DNA.....	18
4.-	TRANSFORMACION.....	18
5.-	DETECCION DE PLASMIDOS.....	19
a)	Extracción del DNA.....	19
b)	Electroforesis.....	20
6.-	EFEECTO DEL AMPC SOBRE LA ACTIVIDAD ST.....	21
7.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ST.....	21

	Página
APENDICE.- MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	23
III.- RESULTADOS.....	26
1.- OBTENCION DE LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES.....	26
2.- DETERMINACION DEL FENOTIPO DE LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES.....	26
3.- DETERMINACION DE LA PRESENCIA FISICA DE LOS PLASMIDOS.....	26
Cuadro 1.- Fenotipo de las cepas extransformantes en los diferentes medios.....	27
4.- EFECTO DEL AMP CICLICO SOBRE LA ACTIVIDAD ST.....	28
Fotografía 1.- Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de lisados tratados con nitro- celulosa de cepas de <u>Escherichia</u> <u>coli</u> extransformantes.....	29
Tabla 1.- Determinación de la actividad de la ente- rotoxina ST en las cepas extransformantes (sin AMPc).....	30
Tabla 2.- Efecto del AMPc sobre la actividad de la enterotoxina ST.....	31
IV.- DISCUSION.....	32
V.- BIBLIOGRAFIA.....	34

RESUMEN.

Con el objeto de estudiar la regulación de la síntesis de la enterotoxina termoestable (Ent ST) de Escherichia coli en el laboratorio clonaron la región ST del plásmido pYK007 (ST⁺ Ap^r Tra) en el vehículo pBR328 y obtuvieron el miniplásmido pYK103 (ST⁺ Tc^r) de 6.73 megadaltones que determinó la hiperproducción de la toxina en las bacterias que lo portaban. Para inferir si esta sobreproducción era causada por una alteración del sitio de interacción promotor-operador del gene ST en el presente trabajo se determinó la dependencia de la actividad ST que codifican los plásmidos pYK102 de 10.6 megadaltones y pYK103 por el complejo 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC)-proteína receptora del AMPC (CRP), observando el efecto de mutantes deficientes en represión catabólica sobre dicha actividad.

Los resultados mostraron que, al igual que sucede en el plásmido pYK007, la enterotoxina ST que codifican los plásmidos pYK102 y pYK103 es dependiente del complejo AMPC-CRP para expresar su actividad en una mutante carente de adenil ciclasa (cya); escasa actividad se detectó en la presencia de AMPC en una mutante carente de la proteína receptora del AMPC (crp) o en una mutante doble (cya crp).

I.- INTRODUCCION.

1.- PLASMIDOS BACTERIANOS.

Los plásmidos bacterianos conforman un grupo de elementos genéticos extracromosómicos autónomamente replicantes, dispensables para la célula huésped (Jacob y col., 1965; Rownd y col., 1966). Los plásmidos pueden dividirse en transferibles y no transferibles por sí mismos. Los plásmidos autotransferibles son capaces de realizar su propia transferencia y movilizar otros elementos genéticos existentes en la bacteria huésped mediante el proceso de conjugación. Una de las características que le confieren los plásmidos autotransferibles a la célula huésped es la formación de apéndices filiformes llamados pili, de relevante importancia en el proceso de conjugación (Meynell y col., 1968). Además, estos apéndices son el sitio de adsorción de ciertos bacteriófagos específicos de plásmidos y ello permite la distinción de 3 clases de pili especificados por plásmidos: pili tipo F, tipo I y tipo N (Meynell y Lawn, 1967 y 1968; Watanabe y col., 1962).

El factor sexual F de Escherichia coli, el primer plásmido autotransferible descubierto (Lederberg y col., 1952), tiene la capacidad de integrarse al cromosoma bacteriano dando lugar a cepas Hfr, que transfieren marcadores cromosómicos a alta frecuencia. Al escindirse el factor F puede llevar información cromosómica, formando elementos autónomos F' (Hayes, 1953).

Entre la diversidad de funciones que codifican los plásmidos están la resistencia a antibióticos, de gran importancia en la epidemiología de las enfermedades infecciosas (Kontomichalou y col., 1970; Watanabe, 1963); la síntesis de bacteriocinas (Nomura, 1967), toxinas (Smith y Halls, 1968), hemolisinas (Smith y Halls, 1967) y antígenos celulares (Ørskov y Ørskov, 1966); resistencia a metales (Chakrabarty, 1976), degradación de hidrocarburos (Benson y Shapiro, 1978) y pesticidas (Fisher y col., 1978), inducción de "tumores" en vegetales (Drummond y Chelton, 1978) e inhibición de la propagación de fagos (van Embden y col., 1976).

Muchos plásmidos con la propiedad de transferibilidad no la manifiestan debido a que se encuentran reprimidos y sólo se transfieren a baja frecuencia (Meynell y Datta, 1967). El factor F es un plásmido desreprimido naturalmente y transferible en una alta frecuencia. Sin embargo, se encontró que la coexistencia en una misma célula del factor F con ciertos factores R de resistencia a antibióticos puede reprimir la transferibilidad de F; a estos plásmidos se les conoce como de fenotipo fi^+ . Otros plásmidos al coexistir con F no inhiben su transferencia, son fi^- (Egawa e Hirota, 1962). Entre los mecanismos de inhibición de la fertilidad, el mejor conocido es el mediado por el sistema fin OP (Finnegan y Willets, 1973).

Los plásmidos no autotransferibles, incapaces de movilizarse durante el proceso de conjugación, pueden ser transferidos por mediación de un plásmido con la propiedad de transferibilidad

(ozeki y col., 1962). Entre los plásmidos no transferibles, los factores colicinogénicos del grupo E son de los más estudiados; ellos determinan la síntesis de una proteína antibiótica (colicina) que tiene un efecto letal sobre bacterias sensibles y confieren inmunidad específica contra esta proteína a las células huéspedes. De acuerdo a su especificidad inmunológica se dividen en factores ColE1, ColE2 y ColE3 (Nomura, 1967).

Si dos o más plásmidos no pueden coexistir en el mismo huésped, causándose la segregación de uno de ellos, ambos pertenecen a un mismo grupo de incompatibilidad (Meynell y col., 1968). Los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad son similares en secuencias de DNA, es decir, que se relacionan estrechamente (Grindley y col., 1973).

Los plásmidos no autotransferibles existen en múltiples copias por cromosoma (replicación relajada) (Rownd, 1969) a diferencia de los plásmidos autotransferibles que se encuentran en una o dos copias por cromosoma (replicación restringida), a excepción del plásmido R6K que está bajo control relajado en E. coli (Kontomichalou, 1970).

2.- PLASMIDOS ENTEROTOXIGENICOS.

Las cepas enterotoxigénicas de E. coli son una causa importante de enfermedades diarreicas en humanos y animales (Dean y

col., 1972; Sack, 1975). Esta patogenicidad depende de su capacidad para colonizar la mucosa intestinal (Evans y col., 1978) y de la producción de una proteína termolábil de alto peso molecular (enterotoxina termolábil, LT) (Sack, 1975) y/o un péptido termoestable de bajo peso molecular (enterotoxina termoestable, ST) (Jacks y Wu, 1974; Levine y col., 1977). Como se mostró en el asa ileal de conejo, la toxina ST tiene un efecto rápido y de corta duración sobre la acumulación de líquido en el intestino, mientras que la toxina LT tiene un efecto lento y de duración prolongada (Evans y col., 1973). El mecanismo de acción de ambas toxinas es diferente: la toxina LT estimula la adenil ciclase de las células del epitelio intestinal (Sack, 1975) y la toxina ST la guanil ciclase (Field y col., 1978; Newsome y col., 1978).

Ciertos plásmidos controlan la producción de factores de colonización y enterotoxinas (Evans y col., 1978; Gyles y col., 1974). Se demostró que algunos de estos plásmidos enterotoxigénicos (Ent) son similares a los factores R de resistencia a drogas; ellos son autotransferibles (Smith y Halls, 1968) y pertenecen al complejo de incompatibilidad F (Santos y col., 1975; So y col., 1975).

En cepas enterotoxigénicas de E. coli de orígenes humano y porcino se mostró que los factores R controlan la multirresistencia a antibióticos (Gyles y col., 1974; Gyles y col., 1977; Meynell y col., 1968; Sack, 1975). Muchos genes de resistencia a antibióticos pueden moverse de un genoma a otro por un evento de recombinación "ilegítima" llamado transposición (Cohen, 1976;

Hedges y Jacob, 1974); esto hace posible que en cepas que porten ambos factores Ent y R tal transferencia se realice y se forme un único plásmido que determine la producción de enterotoxina y la resistencia a droga (McConnell y col., 1979).

La clonación molecular del DNA, base de la ingeniería genética, puede definirse como el aislamiento de un fragmento de DNA en unión covalente con un vehículo capaz de replicarse que sirve como vector de clonación (Hershfield y col., 1974). Este proceso implica la restricción de dos DNAs en secuencias específicas mediante endonucleasas (Bigger y col., 1973; Meselson y Yuan, 1968) que generen extremos cohesivos complementarios o afeitados que pueden volverse a unir covalentemente con DNA ligasa (Dugaiczky y col., 1975; Lobban y Kaiser, 1973). El vector recombinante resultante se introduce a bacterias mediante transformación (Bergmans y col., 1981; Cosloy y Oishi, 1973) o encapsulándolo dentro de una partícula fágica (Hohn y Murray, 1977). El vehículo de clonación debe ser relativamente pequeño y de replicación relajada; se requiere que lleve uno o más marcadores selectivos para permitir la identificación de transformantes y mantener el plásmido en la colonia bacteriana; y debe contener un único sitio de rompimiento para una o más enzimas de restricción en regiones que no sean esenciales para la replicación (Covarrubias y col., 1981; Hershfield y col., 1974). La clonación molecular del DNA se ha empleado para el estudio de determinantes genéticos de procariotes (Chang y Cohen, 1975) y eucariotes (Glover y col., 1975; Kedes y col., 1975; Morrow y col., 1974).

Con el fin de facilitar la purificación y análisis del mecanismo de acción de la enterotoxina ST, So y col. (1976) clonaron la región de DNA que determina la producción de esta toxina procedente de un híbrido ST::pSC101 con un plásmido multicopia ColE1 (Hersfield y col., 1974). Aun cuando el gene de la toxina se amplificó por estar en un plásmido de replicación relajada, sólo se observó un incremento de 3 veces en la síntesis de la toxina.

3.- REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA.

La expresión genética se controla, en parte, en el nivel de la transcripción del DNA. La síntesis de RNA se regula mediante diversos mecanismos.

a) El complejo promotor-operador.

Los genes estructurales determinan la organización molecular de las proteínas. En 1961, Jacob y Monod propusieron el modelo del "operón" para la expresión genética. Un operón consiste de dos o más genes estructurales adyacentes y funcionalmente relacionados, regulados en conjunto a través de una región conocida como el complejo promotor-operador, situada en un extremo de la unidad. El sitio promotor se requiere para la iniciación de la transcripción del operón y el locus operador es el sitio de acción de una proteína represora codificada por el gene regulador del operón.

En E. coli, Salmonella typhimurium y otras bacterias se identificaron varios operones (Bertrand y col., 1975; Kasai, 1974; Musso y col., 1977; Zurawski, 1978), entre los cuales el operón lac de la degradación de lactosa en E. coli es el de organización más sencilla (Jacob y Monod, 1961). El operón de la biosíntesis de la histidina en S. typhimurium, que incluye 9 genes estructurales, es uno de los más complejos (Kasai, 1974).

Los promotores de bacterias y bacteriófagos se pueden dividir en dos grupos. En una clase de promotores la secuencia de nucleótidos contiene toda la información necesaria para el enlace de la RNA polimerasa y la formación de un complejo estable para la iniciación de la transcripción. En otros promotores la secuencia de nucleótidos, y por lo tanto la estructura del DNA, no es suficiente para permitir la formación de tales complejos estables y requiere factores proteicos adicionales. Los promotores dependientes de 3'5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) pertenecen a esta segunda categoría (Taniguchi y col., 1979).

b) Señales de iniciación y terminación de la transcripción.

Una variedad de señales situadas en el DNA regulan la síntesis de RNA mensajero; algunas determinan sitios de iniciación y otras, sitios de terminación para la RNA polimerasa. El control de la transcripción se lleva a cabo por la modulación de la eficiencia con la cual la enzima puede reconocer e interactuar con estos sitios (Rosenberg y Court, 1979).

Una de las secuencias específicas del sitio promotor reconocidas por la RNA polimerasa probablemente sea una región altamente conservada conocida como caja de Pribnow o región -10. Pribnow (1975b), cuando establecía la secuencia de nucleótidos de promotores del colifago T7, localizó una región característica de 7 nucleótidos de longitud

TATPuATPu (Pu = purina)

en la secuencia del promotor cerca del sitio de iniciación de la transcripción. La mayoría de los sitios promotores hasta ahora conocidos en los diferentes colifagos y en el cromosoma de E. coli contienen una secuencia heptanucleotídica con un grado muy alto de homología a la estructura de arriba en la misma posición, o sea, precediendo al sitio de iniciación por 4 ó 5 nucleótidos. Esta región específica forma parte del sitio de enlace de la RNA polimerasa (Reznikoff y Abelson, 1978).

La comparación de las secuencias de diferentes promotores reveló otra región altamente conservada localizada alrededor de 35 nucleótidos antes del sitio de iniciación y que se conoce como la región -35 (Reznikoff y Abelson, 1978).

En 1974, Chamberlin propuso un modelo para la iniciación de la transcripción. Propone que después de una etapa inicial de interacciones no específicas, la RNA polimerasa reconoce un sitio promotor y se enlaza a él formando un complejo libre pero específico, empleando la información de la región -35. Este complejo se conoce como "complejo cerrado" (Chamberlin, 1974) o "complejo de reconocimiento" (Pribnow, 1975a). Después, por apertura de

unos cuantos pares de bases, la enzima hace contacto con las bases, formando un "complejo abierto" usando principalmente la secuencia de información encontrada en la región -10; entonces la polimerización de nucleótidos puede comenzar.

La terminación de la transcripción también ocurre en sitios específicos, aunque la especificidad no es tan estricta en esta etapa como en la iniciación. Un mecanismo regulador muy interesante basado en una señal de terminación en un sitio desusado fue descubierto en el operón de triptófano (trp) por Bertrand y sus colaboradores (1975). Cuando determinaban la secuencia del RNA mensajero de este operón, ellos encontraron que, como también ocurre en muchos otros RNAs mensajeros, una larga secuencia no traducida precede al primer cistron el cual codifica para el polipéptido trp E, la primera proteína del operón trp. La secuencia no traducida de 162 nucleótidos de longitud, llamada "secuencia líder", contiene una señal de terminación ...CUUUUUUUU, alrededor de 30 nucleótidos antes del inicio del gene trp E (Bronson y col., 1973).

La presencia de esta señal de terminación, llamada "atenuador", se estableció en estudios posteriores sobre las secuencias de nucleótidos de las regiones de control del operón trp en DNAs de E. coli y S. typhimurium (Lee y Yanofsky, 1977). En experimentos in vitro, la transcripción del operón trp cesa en este sitio, aunque una fracción menor de moléculas de RNA polimerasa evaden esta señal de terminación y continúan transcribiendo. El atenuador juega un papel regulador: puede prevenir o permitir la expre-

sión de los genes del operón trp. El nivel de triptófano en la célula afecta su función. Los genes se expresan si el nivel del aminoácido es bajo (Bertrand y Yanofsky, 1976; Morse y Morse, 1976). Hay indicaciones de que los atenuadores pueden controlar también la producción de RNA mensajero en otros genomas (Rosenberg y Court, 1979). Estructuras similares se detectaron en los operones de fenilalanina e histidina (Barnes, 1978; Di Nocera y col., 1978; Zurawski y col., 1978).

c) Represión catabólica.

La presencia de glucosa en el medio de cultivo inhibe la síntesis de enzimas catabólicos inducibles en E. coli (Pastan y Adhya, 1976). Magasanik (1961) llamó a este fenómeno represión catabólica. La glucosa disminuye la concentración intracelular del AMP cíclico (AMPC) (Mackman y Sutherland, 1965). La adición al medio de cultivo de AMPC exógeno revierte la represión catabólica causada por la glucosa en los sistemas enzimáticos (De Crombrughe y col., 1969; Perlman y Pastan, 1968). Esto a causa de que el AMPC enlazado a la proteína receptora del AMPC (CRP) es necesario para la iniciación de la transcripción (Pastan y Adhya, 1976; Rickenberg, 1974). La adenil ciclasa cataliza la conversión de ATP a AMPC.

La síntesis de la cloranfenicol acetil transferasa, un sistema constitutivo, está bajo el control del AMPC, aunque no de manera tan estricta como sobre sistemas inducibles (Dottin y col., 1973; Harwood y Smith, 1971).

Dos clases de mutantes se aislaron, las cuales presentan una deficiencia pleiotrópica en la fermentación de diferentes carbohidratos: mutantes con una adenil ciclasa defectuosa (cya) y cuyo fenotipo se revierte al agregar AMPc al medio de cultivo (Brickman y col., 1973; Perlman y Pastan, 1969), y mutantes carentes de la proteína receptora del AMPc (crp), las cuales sobreproducen AMPc y cuyo fenotipo no se afecta por la adición de AMPc exógeno (Sabourin y Beckwith, 1975).

El control de la represión catabólica también se presenta en algunas funciones determinadas por plásmidos, tales como la síntesis de colicina El y de los componentes proteicos del complejo de relajación del factor ColEl (Katz y col., 1973), el establecimiento de la lisogenia en bacteriófagos como lambda en E. coli y P22 en S. typhimurium (Grodzicker y col., 1971; Hong y col., 1971; Yokota y Kasuga, 1972), la expresión de genes de lactosa (Guiso y Ullman, 1976) y, regulada negativamente, la síntesis de pili tipo I de un factor sexual desreprimido en E. coli (Harwood y Meynell, 1975).

4.- REPRESION CATABOLICA DE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA ST.

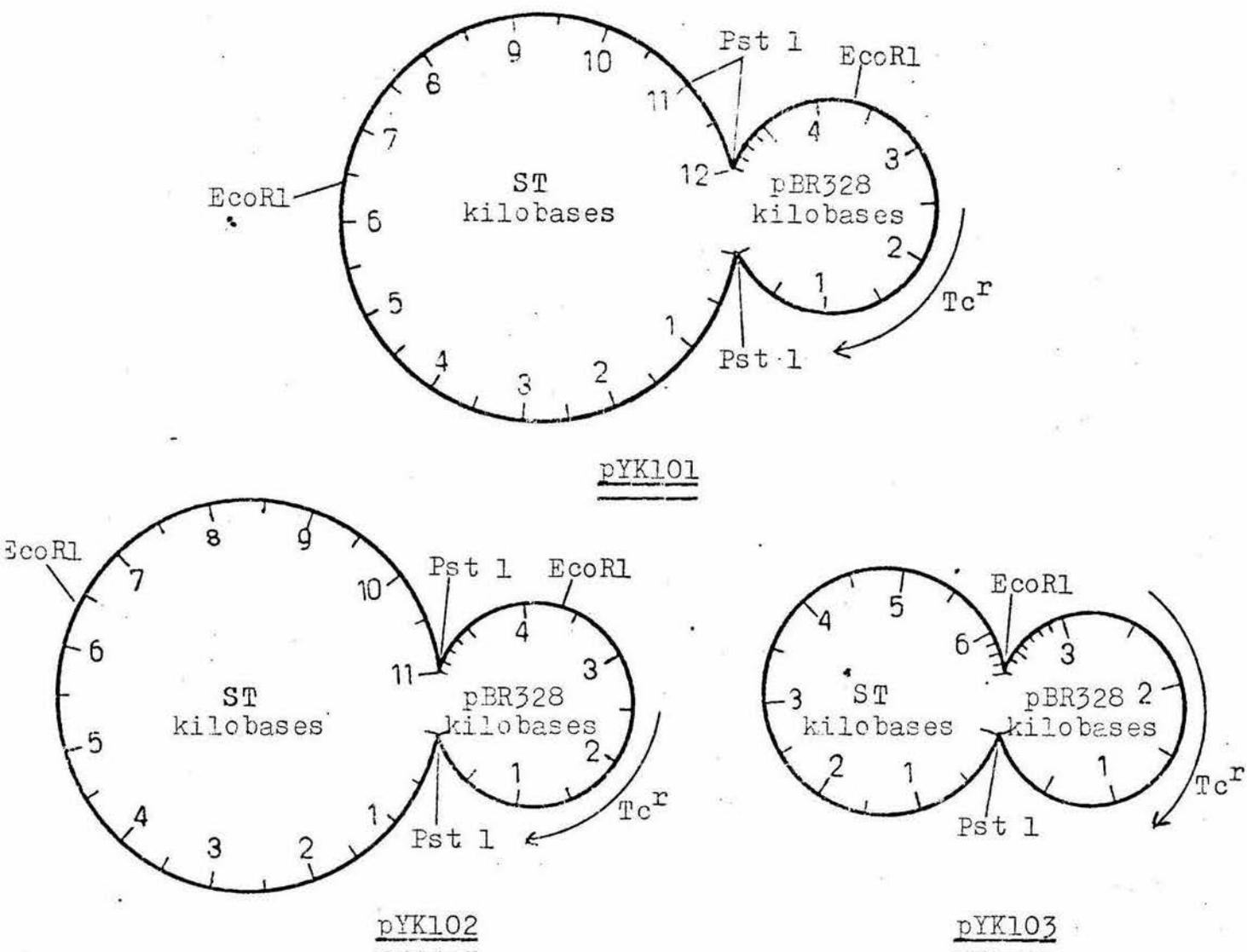
La presencia de glucosa en el medio de cultivo inhibe la síntesis de varias exotoxinas bacterianas, tales como la alfatoxina (Duncan y Cho, 1972) y las enterotoxinas A, B y C de estafilococos (Jarvis y Lawrence, 1975), la estreptolisina S de Streptococcus pyogenes (Calandra y Oginsky, 1973) y un factor de permeabilidad de acción rápida producido por S. typhimurium (Sandefur y

Peterson, 1976), pero existe poca evidencia sobre el posible papel del AMPc en el proceso regulador.

Alderete y Robertson (1977) sugirieron que la síntesis de la enterotoxina ST de E. coli de origen porcino se encuentra bajo el control de la represión catabólica; ellos encontraron que la glucosa reprimía la síntesis de la exotoxina en medio rico o definido. La adición de AMPc a estos cultivos revertía el efecto.

Stieglitz y col., en 1980, aislaron un plásmido de 80 megadaltones (Md) (pYK007) que determina la producción de una enterotoxina ST ligada a la resistencia a ampicilina de una cepa de E. coli de origen humano aislada durante un estudio epidemiológico sobre la etiología de la diarrea. Martínez Cadena y col., en 1981, reportaron que la expresión de la actividad de la toxina ST codificada por el plásmido pYK007 es dependiente de AMPc en una mutante cya. Observaron un incremento de 100 veces en la actividad ST cuando crecieron la cepa CA8306(pYK007)(cya) en la presencia de AMPc. Ninguna actividad se detectó en mutantes crp o cya crp en la presencia de AMPc. Además, demostraron que el efecto del complejo AMPc-CRP no es causado por una modificación del número de copias de DNA plásmido por equivalente cromosómico, ya que la diferencia entre la cepa silvestre y la mutante cya fue menor de 2 veces. Tal efecto tampoco se debe a una alteración en la secreción de una enterotoxina intracelular activa, ya que no encontraron ninguna actividad ST en extractos sónicos de las cepas CA8306(pYK007)(cya) y CA8445(pYK007)(cya crp).

Con el propósito de analizar la regulación de la síntesis de la enterotoxina ST de E. coli, Kupersztoch y col. (comunicación personal) clonaron la región ST del plásmido pYK007 en el vehículo pBR328 (Covarrubias y col., 1981). Para ello H. Stieglitz trató con enzima de restricción Pst I al pYK007, unió los fragmentos con el vector de clonación pBR328, transformó los plásmidos recombinantes resultantes a E. coli e investigó producción de toxina entre las bacterias resistentes a tetraciclina (Tc^R); construyendo así el plásmido pYK101 ($ST^+ Tc^R$) de 16.9 kilopares de bases (kpb). Posteriormente, L. Cervantes localizó en la región ST del pYK101 un sitio adicional susceptible a Pst I, hizo esta restricción y obtuvo el pYK102 ($ST^+ Tc^R$) de 15.9 kpb; redujo aún más el fragmento al eliminar la región EcoRI-EcoRI del pYK102 por restricción y aislar el miniplásmido pYK103 ($ST^+ Tc^R$) de 10.1 kpb (Esquema 1). El plásmido pYK103 hizo a las bacterias que lo portaban hiperproductoras de la toxina, presentándose un incremento de hasta 10 veces en relación a pYK102. El objetivo del presente trabajo fue determinar la dependencia por el complejo AMPc-CRP de la actividad ST codificada por los plásmidos pYK102 y pYK103, observando el efecto de mutantes deficientes en represión catabólica sobre dicha actividad, con el fin de inferir si la hiperproducción de la toxina especificada por el plásmido pYK103 era causada por una alteración del sitio de interacción promotor-operador del gene ST.



ESQUEMA 1.- PLASMIDOS ST.

Al digerir con endonucleasa de restricción Pst I al plásmido pYKOC7 (Ap^R ST^+), unir cada fragmento con el vector de clonación pBR328 de 4.9 kpb, transformar los plásmidos recombinantes resultantes a *E. coli* e investigar las células transformantes resistentes a tetraciclina (Tc^R) para producción de toxina, Heather Stieglitz clonó la región que determina la síntesis de la toxina ST, contruyendo el pYK101 de 16.9 kpb (11.2 Md). Posteriormente, Lourdes Cervantes encontró que la región ST de pYK101 posee un sitio adicional susceptible a Pst I, hizo esta restricción y obtuvo el pYK102 de 15.9 kpb (10.6 Md); redujo aún más el fragmento al tratar al pYK102 con el enzima EcoRI y construir el miniplásmido pYK103 de 10.1 kpb (6.73 Md).

II.- MATERIAL Y METODOS.

1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Se utilizaron las siguientes cepas de E. coli: J54 (Stieglitz y col., 1980) con requerimientos de prolina y metionina y resistente al ácido nalidíxico (50 mg/l); GM31 con requerimientos de treonina, leucina, histidina y tiamina, deficiente en la fermentación de lactosa y galactosa; RRL con requerimientos de leucina, prolina y tiamina; CA8000 HfrH (Brickman y col., 1973) que requiere tiamina (Thi^-); CA8306 HfrH (Brickman y col., 1973) Thi^- , deficiente en la fermentación de maltosa (Mal^-) y con una adenil ciclasa defectuosa (Cya^-); CA8445 HfrH (Sabourin y Beckwith, 1975) Thi^- , Mal^- , Cya^- y carente de la proteína receptora del AMP cíclico (Crp^-); y JK8307 HfrH (Martínez Cadena y col., 1981) Thi^- , Mal^- y Crp^- . El Dr. Jacobo Kupersztach suministró amablemente todas las cepas.

Se utilizaron los siguientes plásmidos que determinan la producción de la toxina ST y confieren resistencia a tetraciclina (25 mg/l) obtenidos por Kupersztach y col. (comunicación personal) durante la clonación de la región ST del plásmido pYK007: pYK102 (10.6 Md) derivado de pYK101 por eliminación de un fragmento por restricción con enzima Pst I y pYK103 (6.73 Md) derivado de pYK102 por eliminación del fragmento EcoRI-EcoRI (Introducción, Esquema 1).

2.- MEDIOS DE CULTIVO.

Para el aislamiento de los plásmidos las cepas se desarrollaron en medio mínimo M9^a suplementado con casaminoácidos (Difco) (5 g/l), glucosa (2 g/l) y tetraciclina (Calbiochem) (10 mg/l). En los experimentos de transformación se empleó el medio L. Para la determinación de los niveles de toxina se utilizó el medio T. Los medio sólidos se prepararon añadiendo agar (15 g/l).

La selección de extrasformantes se realizó sobre cajas de medio L suplementado con tetraciclina (25 mg/l). La respuesta fenotípica de las cepas CA8000, CA8306, CA8445 y JK8307 a la fermentación de maltosa se estudió en medio MacConkey (Difco) suplementado con maltosa (10 g/l) y AMP cíclico (Sigma) (1 g/l).

3.- AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDOS.

a) Preparación de lisados claros.

Para la preparación de lisados claros se utilizó el método de Clewell (1972) modificado. Las centrifugaciones se realizaron en una Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments) con el rotor SS34. Cultivos desarrollados durante la noche de las cepas (GM31(pYK102) y RR1(pYK103)) a 37°C en medio M9 con casaminoácidos, glucosa y tetraciclina fueron diluidos 1:100 en el mismo medio y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 100 unidades Klett (U.K.), con el filtro verde. Después se les añadió cloranfenicol (Calbiochem) (200 mg/l, concentración final) y

^a La composición de los medios de cultivo y soluciones se describe en el apéndice.

se continuó la incubación por 18 horas más. Cada cultivo se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 min a 4°C y se lavó 2 veces con 10 ml de amortiguador TES. La pastilla celular se resuspendió en 2 ml de sacarosa 0.25 M en Tris 0.05 M, pH 8.0, fría. Se añadió 0.4 ml de lisozima (Sigma) (5 g/l en Tris 0.25 M, pH 8.0), se mezcló e incubó por 5 min a 0°C. Posteriormente se agregó 0.8 ml de ácido etilendiaminotetracético disódico (Na_2EDTA) 0.25 M, pH 8.0, continuando la incubación por otros 5 min. Después se añadieron 3.2 ml de mezcla lítica con sarkosil y se continuó la incubación hasta que la suspensión se aclaró y se hizo viscosa. La separación de la mayor parte del DNA cromosómico se realizó por centrifugación a 18, 000 rpm por 20 min a 4°C.

b) Gradientes de CsCl-bromuro de etidio.

De los lisados claros se prepararon gradientes de CsCl-bromuro de etidio (Kupersztuch y col., 1974). El volumen de cada lisado se llevó a 7 ml con TES y se transfirió a un tubo de polialómero (previamente hervido por 5 min en TES) propio para el rotor Beckman Ti 50, el cual contenía 7.06 g de CsCl (Analar); se disolvió la sal y se añadió 0.6 ml de bromuro de etidio (Calbiochem) (5 g/l en agua) mezclando por inversión. Después se colocó la tapa al tubo y se llenó la cámara de aire con nujol. La centrifugación se realizó a 40, 000 rpm por 36 h a 15°C en una Beckman Mod. L5-50.

Después de la centrifugación se iluminó el tubo con luz ultravioleta y se colectó la banda del plásmido perforando el fondo del tubo con una aguja.

c) Concentración de la solución del DNA.

El bromuro de etidio de la fracción colectada del gradiente se extrajo de la siguiente manera: se mezclaron un volumen de una solución saturada de isopropanol-CsCl (Sebring y col., 1971) y un volumen de la solución de DNA, se permitió que las fases se separaran y se removi6 la alcoh6lica; esto se repiti6 3 veces. A continuaci6n se a6adieron 2 vol6menes de amortiguador TES y 0.3 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 6.0. Despu6s se agregaron 6 vol6menes de etanol absoluto a -20°C . Se congel6 durante la noche y se centrifug6 a 10, 000 rpm por 30 min a 4°C . El DNA se resuspendi6 por pipeteo en amortiguador TE.

4.- TRANSFORMACION.

Cultivos desarrollados durante la noche de las cepas receptoras en medio L se diluyeron 1:100 en 50 ml del mismo medio y se incubaron con agitaci6n a 37°C hasta alcanzar una densidad 6ptica de 35 U.K. con el filtro verde. Cada cultivo se enfri6 a 0°C por 15 min y luego se centrifug6 a 10, 000 rpm por 5 min a 4°C . Las c6lulas se lavaron una vez con 50 ml de MgCl 0.1 M y la pastilla celular se resuspendi6 en 25 ml de CaCl_2 0.1 M. La suspensi6n celular se incub6 por 20 min a 0°C ; se centrifug6 a 10, 000 rpm por 5 min a 4°C y la pastilla se resuspendi6 en 2.5 ml de CaCl_2 0.1 M. Se a6adi6 el DNA en soluci6n concentrada y la mezcla se incub6 a 0°C por 30 min seguida por 2 min a 42°C . Posteriormente la mezcla de transformaci6n se diluy6 1:10 en medio L a 37°C y se incub6 por 90 min a 37°C con agitaci6n. Se inocularon cajas de medio L suplementado con tetraciclina (25 mg/1)

con 0.1 ml de diferentes diluciones del cultivo. Las cajas se incubaron por 24 h a 37°C. Varias colonias crecidas en el medio de selección se purificaron estriándolas en el mismo medio.

5.- DETECCION DE PLASMIDOS.

a) Extracción del DNA.

Se empleó el método descrito por Stieglitz y col. (1980). Todas las centrifugaciones se realizaron en una microcentrífuga Eppendorf (aprox. 12, 000 rpm). Porciones de 3 ml de cultivo de las cepas desarrollados en caldo L suplementado con tetraciclina (10 mg/l) durante la noche a 37°C se centrifugaron por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 75 µl de Tris 200 mM, Ph 8.0; se añadieron 75 µl de sacarosa 1 M en Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, fría, 1 µl de Na₂EDTA 100 mM, pH 7.6, 1.2 µl de una solución de lisozima (5 g/l en agua) y 150 µl de agua y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Después se agregaron 60 µl de mezcla lítica de Boyer, se mezcló por inversión repetida y se incubó a 0°C por 15 min o hasta que la solución se volvió clara y ligeramente viscosa. Al lisado se le añadieron 120 µl de agua, 45 µl de NaCl 5 M y 84 µl de pronasa (Calbiochem) (5 g/l en TES, predigerida por 15 min a 37°C) y se incubó por 15 min a 37°C. Posteriormente se realizó una extracción por inmersión durante 15 min con una mezcla de un volumen de fenol y 0.5 volumen de cloroformo. Las fases se separaron por centrifugación por 5 min; la fase acuosa se extrajo libre de fenol con éter dietílico y entonces se ajustó a pH 12.2 con NaOH 5 M y se incubó por 30 min a 37°C; después se neutralizó

con Tris-HCl 2 M. Inmediatamente se agregó un gramo de nitrocelulosa (Comercial Mexicana de Pinturas, S. A.) por ml de solución y se mezcló por inversión durante 15 min. La nitrocelulosa se removió por centrifugación por 5 min y el DNA fue precipitado con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 6.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La solución fue incubada a -20°C durante la noche. Se obtuvo el precipitado por centrifugación por 2 min y se lavó una vez con 200 μl de acetona. Después de drenar y secar la pared interior del tubo, la pastilla se resuspendió en 50 μl de amortiguador TE.

b) Electroforesis.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa (Bio-Rad) al 0.7% en placa. La agarosa fue disuelta en amortiguador Tris-borato, calentando sin que ebuliera. Se enfrió en agua corriente hasta alrededor de 50°C y se aplicó en el espacio existente entre los vidrios de la cámara vertical, previamente sellada con agarosa al 1%. Inmediatamente se colocó el peine y la cámara se dejó a la temperatura del ambiente hasta que la agarosa gelificó. Después se agregó amortiguador Tris-borato al recipiente superior del dispositivo hasta que el líquido cubrió el extremo superior del gel; se retiró el peine. En cada carril se aplicaron 15 μl de una alícuota de DNA con 3 μl de una solución colorante; se corrieron a 125 V, a voltaje constante con una fuente de energía Mod. 493 (Instrumentation Specialties, Co.), por 2 h o hasta que el colorante llegó al fondo del gel. Después el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.4 mg/l) por 15 min; en

seguida se observó sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda larga, Modelo LJ-8 (La Jolla Scientific, Co.).

6.- EFECTO DEL AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD ST.

El efecto del AMPc sobre la actividad ST se estudió empleando el método descrito por Miller (1972) modificado por Martínez Cadena y col. (1981). Las cepas se desarrollaron durante la noche a 37°C en medio T suplementado con tetraciclina (10 mg/l). Los cultivos fueron diluidos 1:50 en el mismo medio y se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 en 620 nm. Entonces cada cultivo se dividió en dos fracciones iguales y a una de ellas se le agregó AMPc (concentración final, 3mM). Se continuó la incubación por una hora más; se centrifugaron los cultivos a 10, 000 rpm por 5 min a 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes para determinar actividad toxigénica.

7.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ST.

En el ensayo de la toxina se utilizó el método de Dean y col. (1972) modificado por Martínez Cadena y col. (1981) empleándose 4 ratones albinos lactantes por muestra. Estos ratones se inocularon intragástricamente con 0.1 ml de cultivo celular filtrado conteniendo 50 µl/ml de una solución de azul de Evans (Merck) al 2%; 4 h después de la inoculación, los ratones se expusieron a vapores de cloroformo. Después de muertos, de cada grupo de 4 ratones, los intestinos fueron extraídos, reunidos y pesados. El resto de los cuerpos se pesó y se determinó la relación entre el peso del intestino y el peso corporal menos el intestino.

Los animales sin colorante en el intestino o con colorante dentro de la cavidad peritoneal se descartaron. La actividad de toxina es reportada como el recíproco de la dilución que dio una relación de peso del intestino a peso corporal mayor o igual que 0.090. Como control negativo se empleó la cepa J54 y como control positivo la cepa J54(pYK007); los valores promedios y sus desviaciones estándares de dos experimentos diferentes para estas cepas fueron, respectivamente, 0.0564 ± 0.0021 y 0.1064 ± 0.0022 .

APENDICE.

MEDIOS DE CULTIVO.

Medio mínimo M9:

NH_4Cl	1.00 g
Na_2HPO_4	6.00 g
KH_2PO_4	3.00 g
NaCl	5.00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.13 g
Agua destilada	1 000 ml

Medio L:

triptona (Difco)	10.0 g
extracto de levadura (Difco)	5.0 g
NaCl	0.5 g
agua destilada	1 000 ml
Disolver y ajustar a pH 7.0 con NaOH 1 M.	

Medio T:

casaminoácidos (Difco)	20.00 g
extracto de levadura	6.00 g
NaCl	2.50 g
KH_2PO_4	8.71 g
solución de sales	1 ml
agua destilada	1 000 ml
Disolver y ajustar a pH 8.5.	

Solución de sales:

MgSO_4	5.0 g
MnCl_2	0.5 g
FeCl_3	0.5 g
H_2SO_4 1 mN	100 ml

Medio de Mac Conkey (Difco):

Peptona de gelatina	17.0 g
Mezcla de peptonas	3.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
NaCl	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.030 g
Cristal violeta	0.001 g

pH final 7.1 aproximadamente

Método de preparación:

Se suspenden 50 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezcle bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Se calienta suavemente agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Esterice en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. El medio estéril fundido se enfría a 45°C, colocándolo en cajas, con 20 ml aproximadamente en cada una. Déjense solidificar las placas destapadas parcialmente.

SOLUCIONES:

Amortiguador TES:
(Concentración final)

NaCl	0.050 M	2.92 g
Na ₂ EDTA	0.005 M	1.46 g
Tris	0.050 M	6.05 g
agua destilada		1 000 ml

Disolver y ajustar a pH 8.0.

Amortiguador Tris 1 M, pH 8.0:

Tris HCl 88.8 g

Trisma base 53.0 g

Disolver con un litro de agua bidestilada. Checar el pH.

Mezcla lítica con sarkosil:		Amortiguador TE:	
		(conc. final)	
sarkosil al 10%	3 ml		
Na ₂ EDTA 0.25 M, pH 8.0	75 ml	Na ₂ EDTA	1 mM 0.372 g
Tris 1 M, pH 8.0	15 ml	Tris	10 mM 1.211 g
agua destilada	7 ml	agua destilada	1 000 ml
		Disolver y ajustar a pH 8.0.	

Mezcla lítica de Boyer:		Amortiguador Tris-borato:	
		(conc. final)	
Tritón X-100 al 10%	3 ml		
Na ₂ EDTA 0.25 M, pH 8.0	75 ml	Tris base	89.0 mM 10.80 g
Tris 1 M, pH 8.0	15 ml	Na ₂ EDTA	2.5 mM 0.93 g
agua destilada	7 ml	ácido bórico	8.9 mM 0.55 g

Solución saturada de isopropanol:		Solución colorante usada	
		en electroforesis:	
CsCl	10.65 g	azul de bromofenol	0.07 g
TES	12.30 ml	SDS	7.00 g
disolver y agregar		glicerol	33.00 ml
isopropanol	15.00 ml	agua destilada	67.00 ml
Mezclar la interfase y permitir- les separarse.			

Abreviaturas:

EDTA = ácido etilendiamino tetracético

SDS = sulfato dodecil de sodio

Tris = tris(hidroximetil)aminometano

III.- RESULTADOS.

1.- OBTENCION DE LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES.

De las cepas CA8000, CA8306, CA8445 y JK8307 transformadas con DNA de los plásmidos pYK102 y pYK103 se obtuvieron células con resistencia a tetraciclina (25 mg/l) la cual es conferida por tales plásmidos. Las cepas originales no presentan resistencia a este antibiótico (Cuadro 1).

2.- DETERMINACION DEL FENOTIPO DE LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES.

Las cepas extransformantes crecieron en medio mínimo suplementado con tetraciclina, pero no las cepas originales. Las cepas CA8306(pYK102) y CA8306(pYK103) carentes de adenil ciclasa solo fermentaron la maltosa en presencia de AMP cíclico y las cepas carentes de CRP no lo hicieron aún en la presencia del nucleótido (Cuadro 1).

3.- DETERMINACION DE LA PRESENCIA FISICA DE LOS PLASMIDOS.

En los resultados obtenidos se nota la presencia de plásmidos de igual movilidad electroforética para cada grupo de extransformantes (con pYK102 y con pYK103), no presentes en la cepa control CA8000. En los carriles correspondientes a las cepas extransformantes pYK102 se observan las bandas correspondientes al monómero superenrollado (P. M. = 10.6 Md) y al monómero circular abierto (mca-2); en los carriles de las cepas con pYK103 se notan los monómeros superenrollado (P. M. = 6.73 Md) y circular

CUADRO 1.- FENOTIPO DE LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES EN LOS DIFERENTES MEDIOS.

CEPA	MEDIO MINIMO ^a	MEDIO MINIMO TETRACICLINA	MAC-CONKEY MALTOSA	MAC-CONKEY MALTOSA AMPc
CA8000 Cya ⁺ , Crp ⁺	+	-	+	+
CA8306 Cya ⁻	+	-	-	+
CA8445 Cya ⁻ , Crp ⁻	+	-	-	-
JK8307 Crp ⁻	+	-	-	-
CA8000(pYK102)	+	+	+	+
CA8306(pYK102)	+	+	-	+
CA8445(pYK102)	+	+	-	-
JK8307(pYK102)	+	+	-	-
CA8000(pYK103)	+	+	+	+
CA8306(pYK103)	+	+	-	+
CA8445(pYK103)	+	+	-	-
JK8307(pYK103)	+	+	-	-

(a) Los medios de cultivo se describen en el apéndice.

+ = crecimiento

- = no crecimiento

En el medio de Mac Conkey-maltosa con y sin AMPc:

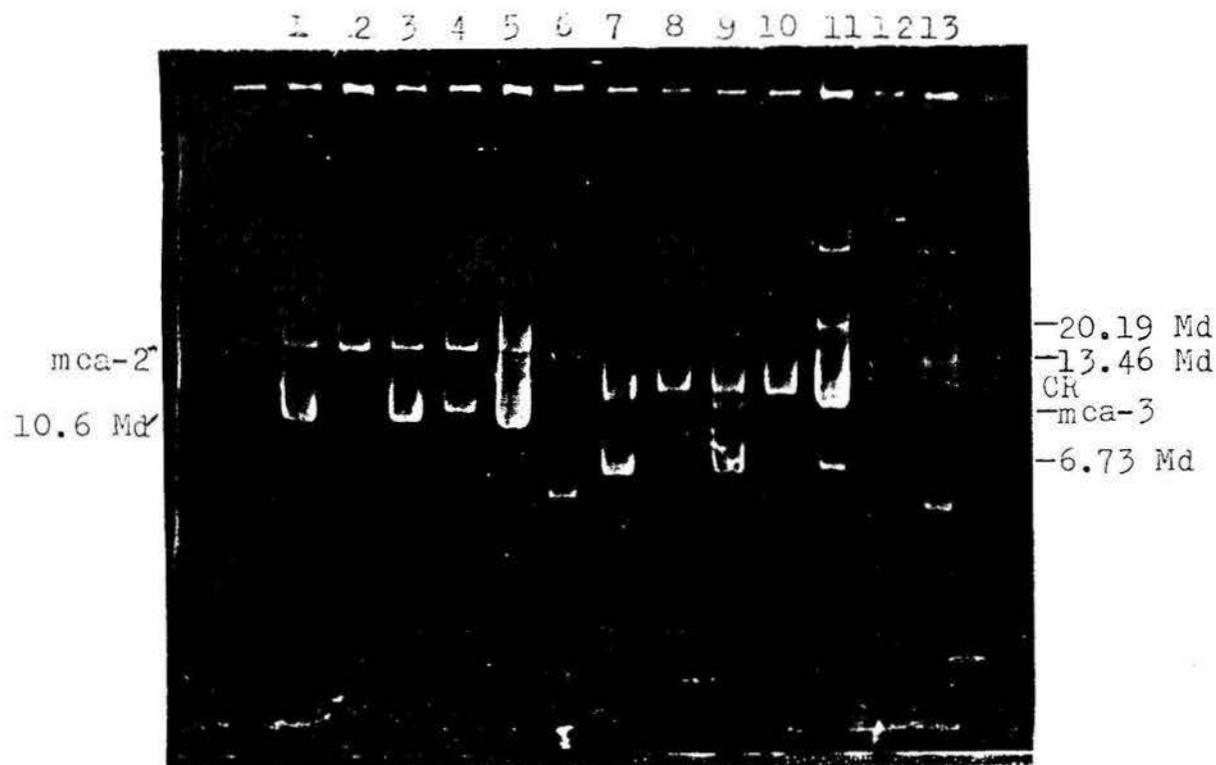
+ = fermentación de maltosa

- = no fermentación de maltosa

abierto (mca-3), además se observan las bandas del dímero (13.46 Md) y trímero (20.19 Md) (Fotografía 1). La cepa 78-IEC contiene plásmidos de pesos moleculares conocidos (Stieglitz y col., 1980), que sirven como marcadores.

4.- EFECTO DEL AMP CICLICO SOBRE LA ACTIVIDAD ST.

Las cepas CA8306(pYK102)(cya) y CA8306(pYK103)(cya) muestran un incremento de 32 veces en la actividad ST cuando son crecidas en medio T en la presencia de AMP cíclico. Las cepas CA8445 (pYK102)(cya crp) y JK8307(pYK102)(crp) en la presencia de AMP cíclico mostraron 32 veces menos actividad que CA8306(pYK102); y las cepas CA8445(pYK103) y JK8307(pYK103) en presencia del nucleótido mostraron 64 veces menos actividad que CA8306(pYK103). Existe un incremento de dos veces de la actividad toxigénica de las cepas CA8000(pYK103) y CA8306(pYK103) con y sin AMP cíclico en relación a las cepas CA8000(pYK102) y CA8306(pYK103). Las cepas silvestres extrasformantes duplicaron su actividad ST en presencia del nucleótido cíclico (Tablas 1 y 2).



FOTOGRAFIA 1.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 0.7% DE LISADOS TRATADOS CON NITROCELULOSA DE CEPAS DE Escherichia coli EXTRANSFORMANTES.

- | | |
|--------------------|---------------------|
| 1.- GM31(pYK102) | 7.- RRL(pYK103) |
| 2.- CA8306(pYK102) | 8.- CA8306(pYK103) |
| 3.- JK8307(pYK102) | 9.- JK8307(pYK103) |
| 4.- CA8445(pYK102) | 10.- CA8445(pYK103) |
| 5.- CA8000(pYK102) | 11.- CA8000(pYK103) |
| 6.- 78-IEC | 12.- CA8000 |
| | 13.- 78-IEC |

CR = DNA cromosómico contaminante

mca-2 = monómero circular abierto de pYK102

mca-3 = monómero circular abierto de pYK103

La cepa 78-IEC posee plásmidos de pesos moleculares conocidos que son usados como marcadores.

TABLA 1.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENTEROTOXINA ST EN LAS CEPAS EXTRANSFORMANTES (SIN AMPc).

CEPA	FENOTIPO RELEVANTE	RAZON P.I./P.C. ^a	ACTIVIDAD ST
CA8000(pYK102)	Silvestre	0.1091 ± 0.0289	32
CA8306(pYK102)	Cya ⁻	0.1046 ± 0.0111	1
CA8445(pYK102)	Cya ⁻ , Crp ⁻	0.1063 ± 0.0004	1
JK8307(pYK102)	Crp ⁻	0.0955 ± 0.0034.	1
CA8000(pYK103)	Silvestre	0.0924 ± 0.0090	64
CA8306(pYK103)	Cya ⁻	0.1007 ± 0.0094	2
CA8445(pYK103)	Cya ⁻ , Crp ⁻	0.0909 ± 0.0051	1
JK8307(pYK103)	Crp ⁻	0.1002 ± 0.0116	1

Las cepas se crecieron en medio T como se describe en Material y Métodos.

(a) Los datos presentados para la razón del peso del intestino al peso corporal son los valores promedios y su desviación estándar de la mayor dilución en la cual el sobrenadante libre de células dio una respuesta positiva en el modelo del ratón lactante, de dos diferentes experimentos.

TABLA 2.- EFECTO DEL AMPc SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENTEROTOXINA ST.

CEPA	FENOTIPO RELEVANTE	RAZON P.I./P.C. ^a	ACTIVIDAD ST
CA8000(pYK102)	Silvestre	0.1179 ± 0.0153	64
CA8306(pYK102)	Cya ⁻	0.1178 ± 0.0026	32
CA8445(pYK102)	Cya ⁻ , Crp ⁻	0.1166 ± 0.0129	1
JK8307(pYK102)	Crp ⁻	0.0980 ± 0.0125	1
CA8000(pYK103)	Silvestre	0.0980 ± 0.0089	128
CA8306(pYK103)	Cya ⁻	0.1011 ± 0.0006	64
CA8445(pYK103)	Cya ⁻ , Crp ⁻	0.0900 ± 0.0010	1
JK8307(pYK103)	Crp ⁻	0.1042 ± 0.0066	1

Las cepas se crecieron en medio T suplementado con AMPc como se describe en Material y Métodos.

(a) Los datos presentados para la razón del peso del intestino al peso corporal son los valores promedios y su desviación estándar de la mayor dilución en la cual el sobrenadante libre de células dio una respuesta positiva en el modelo del ratón lactante, de dos diferentes experimentos.

IV.- DISCUSION.

En el presente trabajo se describe el efecto de bacterias mutantes deficientes en represión catabólica sobre la actividad de la enterotoxina ST codificada por los plásmidos pYK102 y pYK103. Se observó que las cepas mutantes con pYK102 y con pYK103 en la ausencia de AMP cíclico muestran una actividad toxigénica muy reducida, lo que concuerda con la baja síntesis reportada para productos sometidos a represión catabólica en ese fondo genético de la bacteria (Brickman y col., 1973; Perlman y Pastan, 1968). En las mutantes cya este efecto se revertió al añadir AMP cíclico exógeno.

El aumento observado en la actividad toxigénica de las cepas silvestres extrasformantes en presencia de AMP cíclico concuerda con lo observado por Katz y col. (1973), de que la velocidad de replicación del DNA del plásmido es estimulada por el nucleótido, aumentando así el número de copias.

Ya no se observó un gran incremento de la actividad ST en las células portadoras del pYK103 en relación a las que llevan el pYK102. El incremento de dos veces en la actividad ST determinada por pYK103 puede deberse a que este plásmido se encuentre en un número mayor de copias por equivalente cromosómico que pYK102, a causa de su menor tamaño (Esquema 1, Introducción). Esto se podría comprobar investigando el número de copias de estos plásmidos por cromosoma, realizando pruebas de hibridización de cultivos marcados con timidina tritiada contra un exceso de 50 veces de DNA de plásmido purificado enlazado a filtros de ni-

trocelulosa (Frey y col., 1979).

La hiperproducción de la toxina ya no se presenta; la disminución en la actividad ST puede deberse a que las bacterias que sobreproducían toxina son letales y se seleccionó una mutante que ya no sobreproduce toxina.

Con los resultados obtenidos se puede decir que la actividad ST codificada por los plásmidos pYK102 y pYK103 se encuentra bajo el control de la represión catabólica, por lo cual se puede suponer que el sitio de interacción promotor-operador del gene ST no ha sufrido alteración durante el proceso de clonación.

V.- BIBLIOGRAFIA.

Alderete, J. F. y D. C. Robertson (1977). Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 17: 629-633.

Barnes, W. M. (1978). DNA sequence from the histidine operon control region: seven histidine codons in a row. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4281-4285.

Benson, S. y J. Shapiro (1978). TOL is a broad-host-range plasmid. J. Bacteriol. 135: 278-280.

Bergmans, H. E. N., I. M. van Die y W. P. M. Hoekstra (1981). Transformation in Escherichia coli: stages in the process. J. Bacteriol. 146: 564-570.

Bertrand, K., L. Korn, F. Lee, T. Platt, G. L. Squires, C. Squires y C. Yanofsky (1975). New features of the regulation of the tryptophan operon. Science 189: 22-26.

Bertrand, K. y C. Yanofsky (1976). Regulation of transcription termination in the leader region of the tryptophan operon of Escherichia coli involves tryptophan or its metabolic product. J. Mol. Biol. 103: 339-349.

Bigger, C. H., K. Murray y N. E. Murray (1973). Recognition sequence of a restriction enzyme. Nature New Biol. 244: 7-10.

Brickman, E., L. Soll y J. Beckwith (1973). Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in Escherichia coli including deletions of the gene adenyl cyclase. J. Bacteriol. 116: 582-587.

Bronson, M. J., C. Squires y C. Yanofsky (1973). Nucleotide sequences from tryptophan messenger RNA of Escherichia coli: the sequence corresponding to the amino-terminal region of the first polypeptide specified by the operon. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2335-2339.

Calandra, G. B. y E. L. Oginsky (1975). Cellular streptolysin S-related hemolysins of group A streptococcus C2035. Infect. Immun. 12: 13-28.

Clewell, D. B. (1972). Nature of ColE1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloramphenicol. J. Bacteriol. 110: 667-676.

Cohen, S. N. (1976). Transposable genetic elements and plasmid evolution. Nature (London) 263: 731-738.

Cosloy, S. D. y M. Oishi (1973). The nature of the transformation process in Escherichia coli K-12. Mol. Gen. Genet. 124: 1-10.

Covarrubias, L., L. Cervantes, A. Covarrubias, X. Soberón, I. Vichido, A. Blanco, Y. M. Kupersztoch-Portnoy y F. Bolívar (1981). Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 y pBR328. Gene 13: 25-35.

Chakrabarty, A. M. (1976). Plasmids in Pseudomonas. Ann. Rev. Genet. 10: 7-30.

Chamberlin, M. (1974). The selectivity of transcription. Annu. Rev. Biochem. 43: 721-775.

Chang, A. C. Y. y S. N. Cohen (1975). Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of Staphylococcus plasmid genes in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1030-1034.

- Dean, A. G., Y. C. Ching, R. G. Williams y J. E. Harden (1972). Test of E. coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125: 407-411.
- De Crombrughe, B., R. L. Perlman, H. E. Vermus y I. Pastan (1969). Regulation of inducible enzyme synthesis in Escherichia coli by cyclic-adenosine 3', 5' monophosphate. *J. Biol. Chem.* 244: 5828-5835.
- Di Nocera, P. P., F. Blasi, R. Di Lauro, R. Frunzio y C. B. Bruni (1978). Nucleotide sequence of the attenuator region of the histidine operon of Escherichia coli K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4276-4280.
- Dottin, R. P., L. S. Shiner y D. I. Hoar (1973). Adenosine 3', 5'-monophosphate regulation of chloramphenicol acetyl transferase synthesis in vitro from Pl Cm DNA. *Virology* 51: 509-511.
- Drummond, M. H. y M. D. Chelton (1978). Tumor-inducing (Ti) plasmids of Agrobacterium share extensive regions of DNA homology. *J. Bacteriol.* 136: 1178-1183.
- Dugalczyk, A., H. W. Boyer y H. M. Goodman (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96: 171-184.
- Duncan, J. L. y G. J. Cho (1972). Production of staphylococcal alpha-toxin. II. Glucose repression of toxin formation. *Infect. Immun.* 6: 689-694.
- Egawa, R. y Y. Hirota (1962). Inhibition of fertility by multiple drug-resistant factor (R) in Escherichia coli K-12. *Jap. J. Genet.* 37: 66-69.
- Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., y N. F. Pierce (1973). Difference in the response of rabbit intestine to heat-labile and heat-

- stable enterotoxin of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 7: 873-880.
- Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., W. S. Tjos y H. L. Dupont (1978). Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. *Infect. Immun.* 19: 727-736.
- Field, M., L. H. Graf, Jr., W. J. Laird y P. L. Smith (1978). Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2800-2804.
- Finnegan, D. J. y N. S. Willets (1973). The site of action of the F transfer inhibitor. *Mol. Gen. Genet.* 127: 307-316.
- Fisher, P. P., J. Appleton y J. M. Pemberton (1978). Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJPl from Alcaligenes paradoxus. *J. Bacteriol.* 135: 798-804.
- Frey, J., M. Chandler y L. Caro (1979). The effects on an Escherichia coli *dnats* mutation on the replication of the plasmids ColE1, pSC101, R100 y RTF-Tc. *Mol. Gen. Genet.* 174: 117-126.
- Glover, D. M., R. L. White, D. J. Finnegan y D. S. Hogness (1975). Characterization of six cloned DNAs from Drosophila melanogaster, including one which contains the gene for r-RNA. *Cell* 5: 149-157.
- Grindley, N. D. F., G. D. Humphreys y E. S. Anderson (1973). Molecular studies of R factor compatibility groups. *J. Bacteriol.* 115: 387-398.
- Grodzicker, T., R. R. Arditti y H. Eisen (1972). Establishment of repression by lambdaoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of Escherichia coli. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. 69: 366-370.

Guiso, N. y A. Ullman (1976). Expression and regulation of lactose genes carried by plasmids. *J. Bacteriol.* 127: 691-697.

Gyles, C. L., M. So y S. Falkow (1974). The enterotoxin plasmids of Escherichia coli. *J. Infect. Dis.* 130: 40-49.

Gyles, C. L., S. Palchaudhuri y W. K. Maas (1977). Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science* 198: 198-199.

Harwood, J. y D. H. Smith (1971). Catabolite repression of chloramphenicol acetyl transferase synthesis in Escherichia coli K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42: 57-62.

Harwood, C. R. y E. Meynell (1975). Cyclic AMP and the production of sex pili by E. coli K-12 carrying desrepressed sex factors. *Nature (London)* 254: 628-630.

Hayes, W. (1953). The mechanism of genetic recombination in E. coli. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 18: 75-93.

Hedges, R. W. y A. E. Jacob (1974). Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol. Gen. Genet.* 132: 31-40.

Hershfield, V., H. W. Boyer, C. Yanofsky, M. A. Lovett y D. R. Helinski (1974). Plasmid Cole1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3455-3459.

Hohn, B. y K. Murray (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3259-3263.

Hong, J. S., G. Smith y B. N. Ames (1971). Adenosine 3', 5'-

cyclic monophosphate concentration in the bacterial host regulates the viral decision between lysogeny and lysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2258-2262.

Jacks, T. M. y B. J. Wu (1974). Biochemical properties of Escherichia coli low-molecular-weight, heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 9: 342-347.

Jacob, F. y J. Monod (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318-356.

Jacob, F., S. Brenner y F. Cusin (1963). On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348.

Jarvis, A. W. y R. C. Lawrence (1975). Glucose repression of enterotoxins A, B and C and other extracellular proteins in staphylococci in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol. 86: 75-87.

Kasai, T. (1974). Regulation of the expression of the histidine operon in Salmonella typhimurium. Nature 249: 523-527.

Katz, L., D. T. Kingsbury y D. R. Helinski (1973). Stimulation by cyclic adenosine monophosphate of plasmid deoxyribonucleic acid replication and catabolite repression of the plasmid deoxyribonucleic acid protein relaxation complex. J. Bacteriol. 114: 577-591.

Kedes, L. H., A. C. Y. Chang, D. Houseman y S. N. Cohen (1975). Isolation of histone genes from unfractionated sea urchin DNA by Salmonella cloning in Escherichia coli. Nature (London) 255: 533-538.

Kontomichalou, P., M. Mitani y R. C. Clowes (1970). Circular R-factor molecules controlling penicillinase synthesis, replicating in Escherichia coli under either relaxed or stringent con-

trol. J. Bacteriol. 104: 34-44.

Kupersztoch-Portnoy, Y. M., M. A. Lovett y D. R. Helinski (1974). Strand and site specificity of the relaxation event for the relaxation complex of the antibiotic resistance plasmid R6K. Biochemistry 13: 5484-5490.

Lederberg, J., L. L. Cavalli y E. M. Lederberg (1952). Sex compatibility in E. coli. Genetics 37: 720-738.

Lee, F. y C. Yanofsky (1977). Transcription termination at the trp operon attenuators of E. coli and S. typhimurium: RNA secondary structure and regulation of termination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 4365-4369.

Levine, M. M., E. S. Caplan, D. Waterman, R. A. Cash, R. B. Hornick y M. J. Snyder (1977). Diarrhea caused by Escherichia coli that produces only heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 17: 78-82.

Lobban, P. y A. D. Kaiser (1973). Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. J. Mol. Biol. 78: 453-471.

Mackman, R. S. y E. Q. Sutherland (1965). Adenosine 3', 5'-phosphate in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 240: 1309-1314.

Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-256.

Martínez-Cadena, M. G., L. M. Guzmán-Verduzco, H. Stieglitz y Y. M. Kupersztoch-Portnoy (1981). Catabolite repression of Escherichia coli heat-stable enterotoxin activity. J. Bacteriol. 145: 722-728.

McConnell, M. M., G. A. Wilshaw, H. R. Smith, S. M. Scotland y B. Rowe (1979). Transposition of ampicillin resistance to an enterotoxin plasmid in an Escherichia coli strain of human ori-

gin. J. Bacteriol. 139: 346-355.

Meselson, M. y R. Yuan (1968). DNA restriction enzyme from Escherichia coli. Nature 217: 1110-1114.

Meynell, E. y N. Datta (1967). Mutant drug resistant factors of high transmissibility. Nature 214: 885-887.

Meynell, E., G. G. Meynell y N. Datta (1968). Phylogenetic relationship of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bacteriol. Rev. 32: 55-83.

Meynell, G. G. y A. M. Lawn (1967). Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factors Ib by Salmonella typhimurium. Genetic. Res., Camb. 9: 358-367.

Meynell, G. G. y A. M. Lawn (1968). Filamentous phages specific for the I sex factor. Nature (London) 217: 1184-1186.

Miller, J. H. (1972). Cyclic AMP and catabolite repression, p. 412-414. En Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y..

Morrow, J. F., S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, H. M. Goodman y R. Helling (1974). Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1743-1747.

Morse, D. E. y A. N. C. Morse (1976). Dual-control of the tryptophan operon is mediated by both tryptophanyl-tRNA synthetase and the repressor. J. Mol. Biol. 103: 209-226.

Musso, R. E., R. Di Lauro, S. Adhya y B. de Crombrughe (1977). Dual control for transcription of the galactose operon by cyclic AMP and its receptor protein at two interspersed promoters. Cell 12: 847-854.

- Newsome, P. M., M. N. Burgess y N. A. Mullan (1978). Effect of Escherichia coli heat-stable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine. Infect. Immun. 22: 290-291.
- Nomura, M. (1967). Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 21: 257-284.
- Ørskov, I. y F. Ørskov (1966). Episome-carried surface antigen K88 of Escherichia coli. I.- Transmission of the determinant of the K88 antigen and influence on the transfer of chromosomal markers. J. Bacteriol. 91: 69-75.
- Ozeki, H., B. A. D. Stocker y S. M. Smith (1962). Transmission of colicinogeny between strains of S. typhimurium grown together. J. Gen. Microbiol. 28: 671-687.
- Pastan, I. y S. Adhya (1976). Cyclic adenosine 5'-monophosphate in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 40: 527-551.
- Perlman, R. L. y I. Pastan (1968). Cyclic 3', 5'-AMP: stimulation of B-galactosidase and tryptophanase induction in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 656-664.
- Perlman, R. L. y I. Pastan (1969). Pleiotropic deficiency of carbohydrate utilization in an adenyl cyclase deficient mutant of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37: 151-157.
- Pribnow, D. (1975a). Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. J. Mol. Biol. 99: 419-443.
- Pribnow, D. (1975b). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 784-788.
- Reznikoff, W. S. y J. N. Abelson (1978). The lac promoter. En The Operon, Ed. por J. H. Miller y W. S. Reznikoff. Cold Spring

Harbor, p. 221-243.

Rickenberg, H. (1974). Cyclic AMP in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 28: 353-369.

Rosenberg, M. y D. Court (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13: 319-353.

Rownd, R., R. Nakaya y A. Nakamura (1966). Molecular nature of the drug-resistance factors of the Enterobacteriaceae. *J. Mol. Biol.* 17: 376-393.

Rownd, R. (1969). Replication of a bacterial episome under relaxed control. *J. Mol. Biol.* 44: 387-402.

Sabourin, D. y J. Beckwith (1975). Deletion of the Escherichia coli crp gene. *J. Bacteriol.* 122: 338-340.

Sandefur, P. D. y W. Peterson (1976). Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of Salmonella typhimurium. *Infect. Immun.* 14: 671-679.

Santos, D. S., S. Palchaudhuri y W. K. Maas (1975). Genetics and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. *J. Bacteriol.* 124: 1240-1247.

Sebring, E. D., T. J. Kelly, M. M. Thoren y N. P. Salzman (1971). Structure of replicating simian virus 40 deoxyribonucleic acid molecules. *J. Virol.* 3: 478-490.

Smith, H. W. y S. Halls (1967). The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls haemolysin production. *J. Gen. Microbiol.* 47: 153-161.

Smith, H. W. y S. Halls (1968). The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. 52: 319-334.

So, M., J. H. Crosa y S. Falkow (1975). Polynucleotide sequence relationships among Ent plasmids and the relationship between Ent and other plasmids. J. Bacteriol. 121: 234-238.

So, M., H. W. Boyer, M. Betlach y S. Falkow (1976). Molecular cloning of an Escherichia coli plasmid determinant that encodes for the production of heat-stable enterotoxin. J. Bacteriol. 128: 463-472.

Stieglitz, H., R. Fonseca, J. Olarte y Y. M. Kupersztach-Portnoy (1980). Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an Escherichia coli strain of human origin. Infect. Immun. 30: 617-620.

Taniguchi, T., M. O'Neill y B. de Crombrughe (1979). Interaction site of Escherichia coli cyclic AMP receptor protein on DNA of galactose operon promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 5090-5094.

van Embden, J. D. A., W. J. van Leeuwen y P. A. Guinée (1976). Interference with propagation of typing bacteriophages by extra-chromosomal elements in Salmonella typhimurium bacteriophage type 505. J. Bacteriol. 127: 1414-1426.

Watanabe, T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27: 87-115.

Watanabe, T., T. Fukasawa y T. Takano (1962). Conversion of male bacteria of Escherichia coli K-12 to resistance to f phages by infection with the episome "resistance transfer factor". Virology 17: 217-219.

Yokota, T. y T. Kasuga (1972). Requirement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate for formation of the phage lambda receptor in Escherichia coli. J. Bacteriol. 109: 1304-1306.

Zurawski, G., K. Brown, D. Killingly y C. Yanofsky (1978). Nucleotide sequence of the leader region of the phenylalanine operon of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 4271-4275.