



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores
Iztacala



**“Búsqueda por PCR de secuencias
homologas al gen *bor* del bacteriófago
lambda en colifagos silvestres”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O
P R E S E N T A:**

RICARDO GUADARRAMA PEREZ

ASESOR: DR. SERGIO VACA PACHECO

REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE
MÉXICO 2004



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.

Dedicatoria.

Este trabajo esta dedicado a la mujer, madre y amiga que me apoyo, formo y aconsejo durante todo este tiempo; por todo el esfuerzo que realizo. TE ADMIRO.

A ti Ceci: Mil gracias.

A mis hermanos: Oscar y Mauricio.

Agradecimientos.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por permitirme acercarme a la Genética y los fagos, por "aguantarme" todos estos años. Mi admiración y respeto.

Al Biol. Octavio García por sus enseñanzas de biología molecular, por su contribución al desarrollo de este trabajo; por su confianza y apoyo. Por los "interminables" días escuchando a Pink Floyd

A Dolores por ser una mujer admirable y por todas las enseñanzas que me brindo; agradezco el que haya podido compartir toda la carrera contigo.

A mis amigos de la carrera: Diego, por demostrarme que siempre hay tiempo para una chela; Efras, gracias por las interminables pláticas de socialismo y evolución.

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, por su valiosa ayuda y orientación en el desarrollo del trabajo.

A los revisores M. en C. Gloria Paniagua Contreras, M. en C. Eric Monroy Pérez y Dr. Diego Arenas, por sus valiosas observaciones y comentarios que enriquecieron el trabajo y mi formación profesional.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Favi, Ángel, Augusto, Marcela, Alina, Gaby y Paulo, gracias por los buenos momentos que pasamos en genética; "amiguís" gracias por amenizar la estancia en el laboratorio.

A los Biólogos Virgilio Domínguez y José Antonio Acosta, por todo el apoyo y la confianza que me brindaron cuando ingrese al CCH Azcapotzalco.

A Luis, Lucero, Gerardo, Pepe, Gaby y Adriana, gracias por los consejos, atenciones

A mi padre por darme la lección de vida mas grande a la que me eh tenido que enfrentar.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Ciclos de vida de los fagos	2
Transducción	5
Conversión Lisogénica	6
Bacteriofago λ	7
Genes accesorios de λ	12
Gen <i>bor</i>	13
Resistencia al suero	14
Antecedentes	16
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
MATERIALES Y METODO	19
Bacterias y bacteriófagos	19
Obtención de lisados	20
Titulación de lisados	20
Obtención de DNA fagico	21
Amplificación por PCR y clonación del gen <i>bor</i>	22
Ligación del producto de PCR al plásmido pCR 2.1	23
Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i>	24
Selección de colonias que contengan pCR 2.1- <i>bor-like</i>	24
Análisis de restricción para seleccionar colonias positivas que contengan el plásmido pCR 2.1 <i>bor-like</i>	26
Secuenciación de los genes <i>bor-like</i>	26
RESULTADOS	27
Obtención de DNA de fagos	27
Extracción de DNA fagico	27
Amplificación de Secuencias Homólogas al gen <i>bor</i>	28
Clonación de los <i>bor-like</i> en el plásmido pCR2.1 y transformación de <i>E. coli</i> TOP10	30
Árbol filogenético de las secuencias “ <i>bor-like</i> ”	36
Secuencias regulatorias del gen <i>bor</i> del bacteriófago λ .	37
DISCUSIÓN	39
Regulación de la expresión de <i>bor</i>	41
BIBLIOGRAFÍA	43



INTRODUCCIÓN.

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

Los bacteriófagos fueron descubiertos por F. D' Herelle en 1917 (D' Herelle, 1917), siendo este último quien les asignó el nombre de bacteriófagos (devoradores de bacterias). En la década de los 30's Schlesinger (1934) contribuyó importantemente al estudio de los bacteriófagos: purificó una cantidad ponderable de fagos por centrifugación diferencial y filtración gradual de preparaciones crudas de fagos, y realizó el análisis químico, encontrando que estaban constituidos por 50% de proteína y 50% de DNA. El bacteriófago estudiado por D' Herelle y Schlesinger era uno de los fagos T pares de *Escherichia. coli* (T2 ó T4).

En 1938 el notable físico Max Delbruck formó "la escuela del fago", que por más de 10 años dedicó sus esfuerzos al estudio de los fagos T pares, en particular T2 y T4. Este grupo de investigadores hizo varias contribuciones importantes para el conocimiento de los fagos, entre las que destacan el experimento de crecimiento en escalón y el ensayo sobre el crecimiento intracelular del fago (Ellis y Delbruck, 1939).



A partir de los trabajos del grupo de Delbruck nace lo que ahora se conoce como Biología Molecular, y desde el inicio de esta disciplina los bacteriófagos han jugado un papel preponderante en su desarrollo.

Los bacteriófagos constituyen un orden con 13 familias y 30 géneros. Los fagos tienen diversas formas: pueden ser con cola, poliédricos, filamentosos o pleomórficos.

Los fagos son extremadamente comunes en el medio ambiente: hay aproximadamente 10^{10} partículas virales por litro de agua marina (Bergh, Q., *et al*, 1989) y de 10^7 a 10^9 por gramo de sedimento del suelo (Donavaro, R., *et al*, 2001). En el océano, los fagos son los mayores predadores de bacterias, jugando un papel importante en el ciclo de nutrientes esenciales, por ejemplo: nitrógeno y fósforo (Wilhems, S., W *et al*, 1999).

Ciclos de vida de los fagos.

Los fagos presentan dos ciclos de “vida” definidos: la infección comienza por la colisión al azar entre un fago y una bacteria, que resulta en la adsorción del fago a un receptor específico de la superficie bacteriana por una reacción de afinidad estereoquímica. Posteriormente el fago inyecta su DNA al interior de la célula; éste es introducido de manera lineal al interior de la bacteria, donde dirige la síntesis de proteínas estructurales fágicas y la replicación de su propio DNA, cuyas copias se encapsidarán para formar a los nuevos viriones. Estos serán liberados (*eclosión*) al lisarse la bacteria por acción de enzimas hidrolíticas,



codificadas por el propio genoma viral. Estos viriones pueden reiniciar el ciclo infectando otras bacterias. A este ciclo se le conoce como **vía lítica**.

Algunos fagos, llamados temperados, como λ (lambda) de *E. coli*, presentan un ciclo de vida alternativo, denominado **vía lisogénica**. Esta ocurre de manera similar a la vía lítica, en cuanto a la adsorción e inyección; sin embargo, el DNA fágico se integra al cromosoma bacteriano. La expresión de los genes estructurales, de lisis y de aquéllos que participan en la replicación del DNA fágico, es reprimida por acción de la proteína represora codificada por el mismo genoma viral. De esta forma, durante la lisogenia se expresa el gen que mantiene reprimidos los genes del ciclo lítico, estructurales y de lisis quedando integrado de manera estable el DNA viral, al cual en esta condición se le denomina profago y a la bacteria que lo porta lisógena (figura 1).

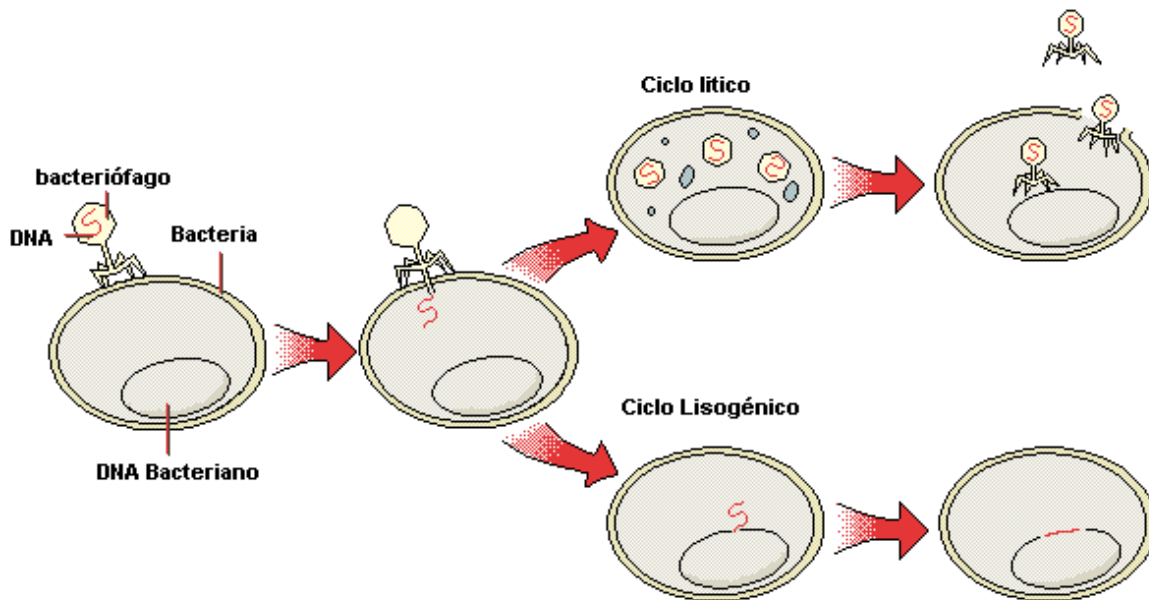


Figura 1. Ciclos de vida de los bacteriófagos líticos y temperados.



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

En un cultivo de lisógenas la desrepresión ocurre espontáneamente a baja frecuencia (10^{-6}), ocasionando que haya fagos libres. Es posible también que ocurra desrepresión transitoria; es decir, que falle la represión por un breve lapso y se restablezca enseguida, dando lugar a bacterias “curadas” que han perdido el profago, ya que, si éste se encontraba integrado al cromosoma, se escinde pero es incapaz de iniciar la vía lítica al restablecerse la represión, de modo que ya no se replica como parte del cromosoma bacteriano ni en forma autónoma y se pierde por dilución a medida que el cultivo crece.

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



lisogenia se caracteriza por 4 propiedades: 1) Heredabilidad, 2) Inducibilidad, 3) Inmunidad y 4) Curabilidad.

Transducción.

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

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

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

En la transducción generalizada algunos profagos, producidos a baja frecuencia (aprox. 10^{-7}) durante la infección de la cepa donadora, incorporan al azar en su cápside segmentos de DNA bacteriano cuyo tamaño es similar al del



propio genoma viral. Al infectar posteriormente a la cepa receptora, el fago solamente sirve como vehículo para introducir el DNA de la donadora, el cual se apareja con la región homóloga del cromosoma bacteriano, *reemplazando* ese segmento por recombinación; no se produce progenie viral toda vez que el fago transductor no posee DNA propio. Los fagos son los mayores conductores de intercambio genético, transduciendo una cantidad estimada de 10^{25} a 10^{28} pb de DNA por año en el mundo oceánico (Paul, J., H., 1999).

Conversión Lisogénica.

La conversión lisogénica se define como la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediada por un profago (Barksdale y Arden, 1974). Existen numerosos ejemplos de toxinas bacterianas codificadas por bacteriófagos (Bishai y Murphy, 1988); entre éstas se encuentran: la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae* (Freeman, 1951), las toxinas eritrogénicas de *Streptococcus pyogenes* (Nida y Ferreti, 1982); la estafilocinasa y la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (Coleman, et al., 1989). Además de los genes que codifican para toxinas, se han descrito otros que codifican para una acetilasa del antígeno O de *Shigella flexneri* (Clark et al, 1991), genes para la producción de cápsula en *Streptococcus pneumoniae* (Russel, 1991).



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

Bacteriófago λ

El fago λ de *E. coli* (figura 2) está compuesto por aproximadamente 50% de DNA de doble cadena y 50% de proteína. El tamaño de su genoma es de 48 502 pb, que corresponden a una masa de 32×10^6 Da. La molécula de DNA está contenida en una cápside icosaédrica de 0.055μ de diámetro que se encuentra unida a una cola tubular de 0.15μ de longitud.

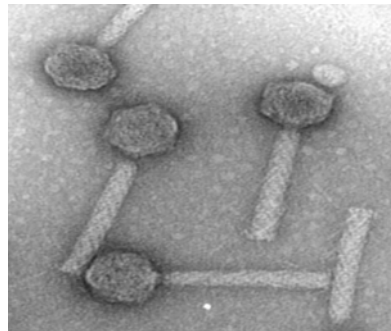


Figura 2. Bacteriófago λ . Micrografía electrónica que muestra la estructura de las partículas del fago λ .

El DNA de λ posee extremos cohesivos de cadena sencilla (12 b) en ambos extremos 5' que le permiten circularizarse después de la inyección a la célula (Hershey, *et al.*, 1963; Young y Sinsheimer, 1964). El genoma de λ expresa aproximadamente 50 proteínas (Szybalski y Szybalski, 1979). Los genes de λ refleja su orden de expresión temporal (figura 3).

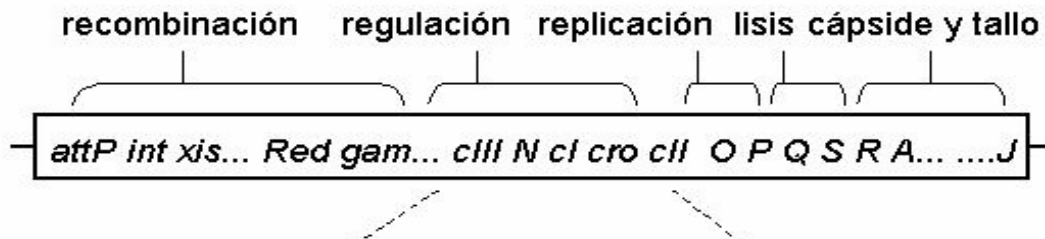


Figura 3. Los genes de λ se encuentran agrupados por función en su genoma.

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

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

Después de la inyección, el DNA de λ se circulariza, por apareamiento de los extremos cohesivos, y es transcrito por la RNA polimerasa bacteriana a partir de



dos promotores: P_R y P_L . La transcripción a partir de P_L se extiende hasta el terminador t_{L1} originando un transcrito de unos 1000 nucleótidos (Roberts, 1969), cuya traducción produce la proteína N (12.2 kDa) (Franklin y Bennet, 1979). El transcrito iniciado en P_R termina en t_{R1} y su traducción da origen a la proteína Cro (Roberts, 1969). En presencia de la proteína N la RNA polimerasa es capaz de trascender las señales de terminación (t_{L1} , t_{R1} y t_{R2}) y la transcripción iniciada en P_L se extiende hasta la región *cIII-b*, en tanto que la transcripción de P_R se extiende hasta la región *cII-O-P-Q* (Gottesman *et al.*, 1980) (figura 4).

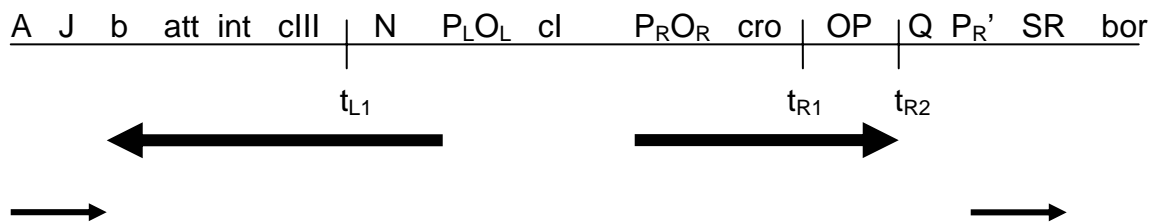


Figura 4. La transcripción del genoma de λ comienza en P_L y P_R . La proteína N, junto con proteínas bacterianas, permite la antiterminación de la transcripción en t_{L1} , t_{R1} y t_{R2} (Flechas gruesas). La transcripción de los genes tardíos se origina en P_R y, en el genoma circular, se extiende (por antiterminación mediada por pQ) hasta los genes estructurales A-J (flechas delgadas). Es probable que el gen *bor* posea su propio promotor.

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

Hasta este punto, las células infectadas contienen proteínas necesarias tanto para el crecimiento lisogénico (*cII* y *cIII*, que se requieren para la

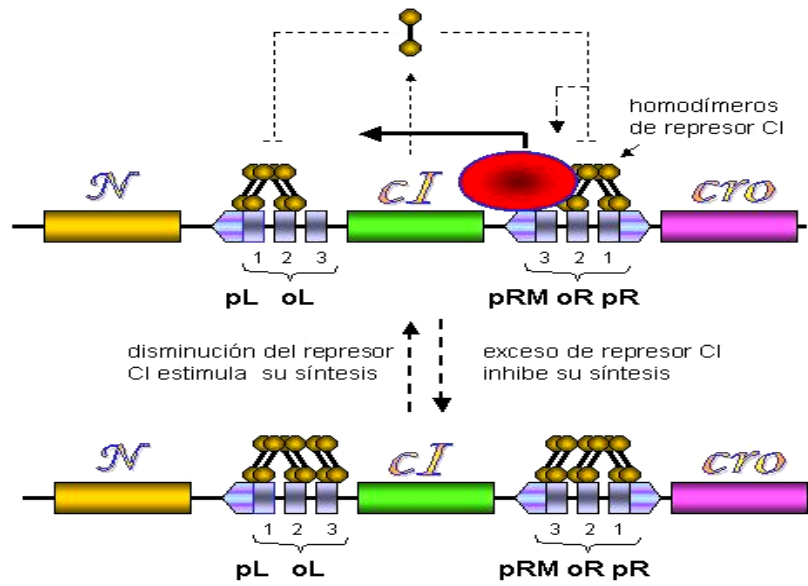


Figura 6. Mantenimiento de la lisogenia. El represor CI forma homodímeros y se une en forma cooperativa a oL1 y oL2 del lado izquierdo y a oR1 y oR2 del lado derecho, bloqueando la acción de los promotores pL y pR, respectivamente. La unión del represor CI a oR2 estimula la transcripción del promotor pRM, o sea, estimula su propia síntesis. Un exceso de represor CI es capaz de unirse a oR3 e inhibir su síntesis

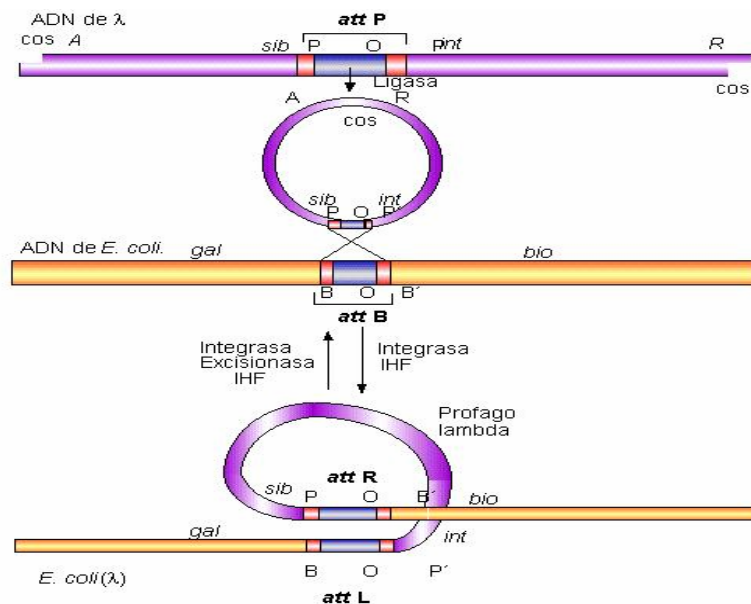


Figura 7. Integración y escisión del DNA de λ . La integración del genoma viral al bacteriano ocurre entre los operones *gal* y *bio* mediante recombinación entre los sitios *att* del fago (POP') y del cromosoma bacteriano (BOB'). La recombinación entre los sitios BOP' y POB' permite la escisión del DNA de λ si el profago es inducido al crecimiento lítico. La integración está mediada por la proteína viral Int, en tanto que la escisión requiere Int y Xis. En ambas reacciones participa el factor de integración del huésped (IHF), codificado por dos genes bacterianos. (Tomado de Echols y Guarneros, 1983).



Genes accesorios de λ

Los genes de λ que no se requieren para lisis ni para lisogenia se denominan accesorios. Estos genes se encuentran distribuidos en varias partes del genoma. El segmento mayor de DNA dispensable corresponde a 33% del genoma y se localiza entre el gen *J* y el gen *N* (ver figuras 3 y 4). Este segmento incluye a los genes de la región *b*, a la izquierda de *att*, y los genes del operón P_L a la derecha de *att*. El gen *rex* (situado inmediatamente a la izquierda de *ci*) tampoco se requiere para la formación de placas líticas. Otra región dispensable del genoma de λ se encuentra situada a la derecha de los genes *O* y *P*; la deleción de un segmento de 2.8 kb (deleción *nin5*) en esta región no tiene efecto alguno sobre el desarrollo del fago. Por último, hasta hace poco no se habían localizado genes en las últimas 2 kb del extremo derecho del genoma de λ (a la derecha del gen *R*), sin embargo en 1990 se describió al gen *bor*, localizado a la derecha de *R* (Barondess y Beckwith, 1990), (figura 8).



Fig 8. Localización de *bor* en el cromosoma de λ



Gen *bor*.

Entre los genes fágicos reportados que contribuyen a la virulencia bacteriana se encuentra el gen ***bor*** del fago λ . Este gen es expresado durante la lisogenia y codifica para una lipoproteína, localizada en la membrana externa de *E. coli*, que le confiere resistencia al efecto bactericida del suero humano. El gen *bor* posee homología a nivel de secuencia con el locus *iss* del plásmido ColV, I-K94 de *E. coli*, el cual le confiere resistencia al suero de mamíferos. La homología total del DNA de λ e *iss* es de 81%, excluyendo los gaps. El locus *iss* parece ser un fragmento de λ (o, viceversa), y es probable que el locus se haya originado por una recombinación entre ColV, I-K94 y λ o con un fago relacionado (Barondess *et al*, 1995).

El marco de lectura abierto *iss*, es homólogo a *bor* en un 93% y codifica para una proteína de 102 aminoácidos la cual es 79% idéntica a Bor. Se ha demostrado que *bor* tiene el mismo efecto que *iss in vitro*, promoviendo un incremento de 20 veces en la sobrevivencia de *E. coli* K12 lisógena contra el efecto bactericida del suero de cobayo lo que demuestra que éstas proteínas homólogas tienen una función similar (Barondess *et al*, 1995).

La región amino terminal de Bor tiene las características estructurales de una secuencia señal de anclaje (Barondess *et al*, 1990; von Hejine 1990), y se ha reportado que su información de exportación reside en los residuos N-terminal (Barondess *et al*, 1990). Se ha estimado que hay aproximadamente 2000 moléculas de Bor por célula.



Se ha reportado un gran número de proteínas de membrana externa que están involucradas en la resistencia al suero. Estas incluyen a Rck (Heffernan, *et al*, 1992) y Ail (Bliska *et al*, 1992; Pierson *et al*, 1993), la proteína OmpA de *E. coli*, la proteína M de *S. pyogenes*, la proteína porina gonococal P1 (Carbonetti *et al*, 1990), TraT, proteína relacionada al plásmido R100, R6-5, y ColV,I-K94 (Pfaff-McDonough, S., J *et al*, 2000) de *E. coli* y de los plásmidos de virulencia de *Salmonella*, y el producto del gen *tcpC* de *Vibrio cholerae* (Ogierman *et al*, 1992); (Parsot *et al*, 1991).

Resistencia al Suero.

La actividad bactericida del suero es un importante mecanismo de defensa contra las infecciones bacterianas. El suero animal o humano contiene el complemento y lisozimas, cuya acción combinada tiene una acción litica sobre la superficie bacteriana, lo cual es letal para muchas bacterias gram negativas; de esta manera los animales previenen la invasión de la sangre por los microorganismos (Taylor, P. W. 1983). La resistencia al efecto bactericida del suero es considerada una importante propiedad de virulencia de las bacterias invasivas.

La cascada del complemento es una potente defensa inmune antimicrobiana que puede ser activada por diferentes vías. La vía clásica del complemento es usualmente iniciada por la unión de un anticuerpo a la superficie bacteriana. La proteína C1 del complemento se une a la región Fc de dos anticuerpos en estrecha proximidad, y sufre un cambio conformacional para comenzar la actividad



proteolítica. La proteína C1 activada se une a C4 y C2 para formar la convertasa C3, C2b4a, la cual se une a C3 comenzando la producción de C3b y la activación del resto de la cascada del complemento (figura 9) (Barnes, M., *et al*, 2003).

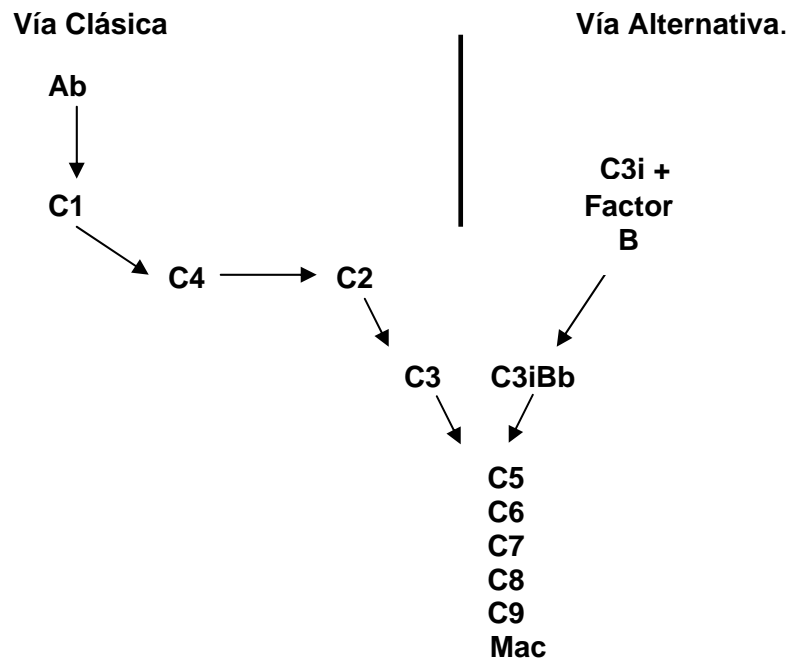


Figura 9. Activación de la cascada del complemento. La cascada del complemento consiste de la vía clásica y la vía alternativa. La vía clásica puede ser activada por C1 en la presencia de un anticuerpo (Ab). La vía alternativa es siempre inducida en un bajo nivel, y la amplificación es controlada por complejas interacciones entre factores reguladores positivos y negativos. La vía clásica y alternativa convergen en C3, comenzando por la activación de C5 a través de C9 y la formación del complejo de unión a la membrana (MAC).

C1 puede activar la vía clásica en la ausencia del anticuerpo por unión directa a proteínas de la bacteria blanco, por ejemplo las porinas (Mintz, CS., *et al*, 1995). El lipopolisacarido (LPS) puede afectar la deposición de C1 sobre la membrana, ya que lo hace sobre el LPS y de esta forma evita la muerte de la bacteria (Merino, S., *et al*, 1998).



La vía alterna es activada por la interacción de C3 con el factor B (figura. 9) comenzando por la formación de C3iBb, la vía alternativa-C3-convertasa. La vía alterna puede además proveer la amplificación de la vía clásica usando C3b generado por la vía clásica para crear más cantidad del complejo C3 convertasa (C3bBb) (Walport, M. J., 2001).

La resistencia de *E. coli* al complemento, en general, ha sido relacionada a distintos factores estructurales, incluyendo un antígeno-K1 capsular u otro tipo de cápsula, un LPS liso y ciertas proteínas de membrana externa (OMPs) incluyendo TraT, Iss y OmpA.

La cápsula parece tener un papel muy importante en la virulencia y resistencia al suero de *E. coli* en infecciones extraintestinales de humanos, tales como sepsis, meningitis y pielonefritis.

Antecedentes.

Barondess *et al*, encontraron que proteínas relacionadas con Bor son expresadas en un gran número de lisógenas para colifagos lambdoides y en algunos aislados clínicos de *E. coli*. Estos mismos autores observaron que *bor* está disperso entre colifagos lambdoides, ya que proteínas relacionadas fueron encontradas en las lisógenas de los fagos 21, 82, 424, 44, 731, 802 y 83, utilizados en este mismo trabajo.

La resistencia al suero parece ser una característica de virulencia muy propagada en *E. coli* de aves, y se ha sugerido que la posesión de factores que confieren esta resistencia puede usarse para distinguir las formas virulentas de



las no virulentas (Ellis *et al.*, 1988; Ike *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 1992; Fantinatti *et al.*, 1994; Ngeleka *et al.*, 1996; Parreira *et al.*, 1998). En cepas de diferentes serotipos, aisladas de diferentes hospederos, se encontraron secuencias del gen *iss* (Pfaff-McDonough, S., J *et al.*, 2000). Por otro lado se encontraron secuencias relacionadas con *iss* en cepas aisladas de aves enfermas de colibacilosis y sólo en pocas sanas; esto sugiere que *iss* puede ser un importante factor de virulencia, además de que puede ser utilizado como un marcador molecular para identificar cepas de *E. coli* que causan colibacilosis de las que no.

En otro trabajo en el que se usaron 86 cepas de *E. coli*, aisladas de niños con infecciones urinarias o con diarrea, se reportó que 84.8% (39/46) de las alfa-hemolíticas fueron resistentes al efecto bactericida del suero a concentración de 10%, en tanto que sólo 67.5% (27/40) de las no hemolíticas fueron resistentes. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas del tracto urinario y las intestinales. La resistencia al suero fue alta en los serogrupos O6, O18 y O75 (Rizvi, M., K., S. 2003).

Dada la importancia clínica que podría representar la adquisición de un gen que confiera resistencia al suero por una bacteria o por un bacteriófago, es importante estudiar la diseminación de genes homólogos a *bor* en el cromosoma de otros fagos temperados ya que como se mencionó en las líneas anteriores, la posibilidad de que bacterias adquieran este gen por medio de la lisogenia, implica que estas incrementen su virulencia, disminuyendo la posibilidad de ser



eliminadas cuando infecten a su hospedero. Por otro lado, las lisogenas o fagos portadores de este gen, podrían tener ventajas selectivas en nichos ecológicos específicos.

OBJETIVO GENERAL:

- Buscar por PCR secuencias homólogas al gen *bor* en colifagos silvestres.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Obtener DNA de los diferentes fagos, para ser utilizado en la reacción de PCR.
- 2) Clonar los productos de PCR en el plásmido pCR 2.1 para ser secuenciados.
- 3) Realizar árboles filogenéticos para establecer relaciones evolutivas entre los genes homólogos.



MATERIAL Y METODOS.

Todos los medios utilizados para crecer las bacterias se obtuvieron de Merck y Bioxón de México. Estos fueron: Caldo Nutritivo (CN) y Agar nutritivo (AN) para las cepas de *E. coli*. El agar suave (AS) para plaquear los fagos fue CN con 0.6% de agarosa.

Buffer SM (NaCl 0.58 g, MgSO₄ 0.2 g, 5 ml Tris-HCl 1 M pH 7.5, 0.5 ml de gelatina 2% se afora a 100 ml y se esteriliza). Solución de precipitación para fagos: Polietilenglicol 8000 al 20% en NaCl 2.5 M. Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA). TBE 5X (54 g Tris-base, 27.5 g ácido bórico, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8, se afora a un litro y se esteriliza).

Bacterias y bacteriófagos.

Las cepas de *E. coli* K12 utilizadas en este trabajo fueron: W3110 (donada por el Dr. Luis Kameyama, CINVESTAV, México, DF), LE392, DH5 α y TOP10.

Los bacteriófagos de *E. coli* fueron: λ . Los 6 colífagos silvestres fueron donados por el Dr. Kameyama. Estos fagos clasificados por grupo de inmunidad, se muestran en la tabla 1; el grupo de inmunidad I representa fagos identificados como no-lambdoides, mientras que los 5 restantes son fagos lambdoides. Los fagos 933W y Stx fueron donados por el Dr. G. Guarneros (CINVESTAV, México, D.F).



Grupo de Inmunidad	Bacteriófago
I	mEp 038
VII	mEp 173
XVIII	mEp 123
XIV	mEp 460
XV	mEp 506
V	mEp 064

TABLA 1. Colifagos silvestres utilizados en este estudio. mEp= fagos mexicanos de *E. coli* (Kameyama *et al*, 1999).

Obtención de lisados

Para obtener los lisados de fagos, se generaron placas aisladas en medio sólido. Posteriormente se mezcló una placa de cada fago en 3 ml de CN y 0.3 ml de bacteria sensible; esta mezcla se incubó a 150 rpm a 37° C, hasta lisis (3-6 h). Al término de esta incubación, se agregaron unas gotas de cloroformo y se incubó durante 15 minutos más, se centrifugo a 5000 rpm/15 min, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril, para su almacenamiento a 4° C, añadiéndole una gota de cloroformo.

Titulación de lisados.

Se sembró una asada de bacteria sensible en CN y se dejó crecer 12-16 h en agitación a 37° C. Posteriormente se hicieron diluciones 10^{-6} y 10^{-7} de cada stock de fago en SM, y se tomó 0.1 ml de cada dilución, mezclando con 0.2 ml de



bacteria sensible y 3 ml de AS; se agitó y vació en placas de AN, y se incubaron a 37° C/12 h. Al término, se contó el número de placas de cada dilución (ufp= unidades formadoras de placa), y se estimó el título por la siguiente fórmula:

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

Obtención de DNA fágico.

Para la obtención de DNA de fagos se realizó la técnica de lisado en capa confluyente en medio sólido de agarosa descrita por Sambrook *et al.*, 1989. Para lo cual 100 µl de cada suspensión de bacteriófago se mezclaron con 0.3 ml de la bacteria receptora, se les adicionó 3 ml de AS y se vertieron sobre medio sólido a temperatura ambiente. Las cajas se incubaron hasta lisis bacteriana total a 37°C (aproximadamente 6 h). Posteriormente se añadió 5 ml de SM a cada caja y se incubaron a 4°C durante 6 h. La suspensión se colectó y se le agregaron 50 µl de cloroformo; se incubó a 37°C durante 15 min. en agitación constante. Los restos celulares se separaron por centrifugación durante 15 min. a 4000 r.p.m. a 4°C desechándose la pastilla. Al sobrenadante se le agregaron 10 ml de solución de precipitación (PEG) incubándose durante 24 h a 4°C. La suspensión se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se desechó, recuperándose las pastillas. Estas se resuspendieron en 500 µl de Tris-EDTA (TE) para liberar el DNA y se le agregó 250 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (dos veces) para separar proteínas y lípidos del DNA; se centrifugó y la fase acuosa final se precipitó con 1/10 de acetato



de sodio 3M pH 5.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante 1h a -20°C . Transcurrido el tiempo se centrifugaron las soluciones a 14000 r.p.m. durante 15 min a 4°C . Se lavaron las pastillas 2 veces por centrifugación con etanol al 70%, las pastillas de DNA se resuspendieron en 100 μl de agua desionizada estéril. La calidad y concentración de DNA obtenido de los fagos se analizo en un gel de agarosa al 0.8%, realizando una electroforesis con las siguientes condiciones de corrimiento: 30 min. a 120 volts y 94 mA.

Amplificación por PCR y clonación del gen *bor*.

La estrategia para amplificar y clonar a *bor* fue la siguiente: se diseñaron primers por medio del programa OLIGO 2.1, complementarios a la secuencia reportada para *bor* del fago λ GeneBank (número de acceso NC_001416), flaqueando a partir del codón de inicio (primer upper) hasta el codón de término de la transcripción (primer lower). La secuencia de los primers diseñados fue la siguiente:

5' accatgaaaaaatgctactcgatactgc 3' primer upper

5' ttattgtgagcaatacacacgcgcttcca 3' primer lower

Se verificó que los primers diseñados fueran específicos para el gen *bor* de lambda mediante el programa Blast(N) <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>



Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

DNA	200 ng
Primer lower	25 pmoles
Primer upper	25 pmoles
Buffer 10X	1X
dntp' s	0.2 mM
MgCl₂	1.5 mM
H₂O d. i.	Aforar a 50 µl

Las condiciones de tiempo y temperatura fueron:

94°C 5 min.	1 ciclo
94°C 1 min.	25 ciclos
55°C 1 min.	
72°C 1 min.	
72°C 10 min.	1 ciclo

Ligación del producto de PCR al plasmido pCR 2.1.

La ligación del producto de PCR se realizó según el protocolo descrito en el manual de Invitrogen, la siguiente tabla describe la reacción de ligación:



REACTIVOS	CANTIDAD
Producto de PCR	0.5 a 4 μ l
Solución salina	1 μ l
Agua estéril	Agregar a un volumen de 5 μ l
TOPO vector (pCR 2.1)	1 μ l
Volumen final	6 μl

Transformación de bacterias competentes *E. coli* TOP10 (Invitrogen) con la reacción de transformación por choque térmico.

30 μ l de bacterias competentes *E.coli* TOP10 mezclados con 3 μ l de reacción de ligación se incubaron en hielo durante 30 min., posteriormente se transfirieron a un baño a 42° C por 90 seg. , por último se incubaron nuevamente en hielo por 2 min. A las bacterias se les adicionó 250 μ l de caldo nutritivo y se incubaron en agitación constante a 3500 rpm a 37° C por una hora. Transcurrido el tiempo, las bacterias transformadas se espatularon en placas de agar nutritivo con 100 μ g/ml de ampicilina, incubándose a 37° C por 24 horas.

Selección de colonias que contengan pCR 2.1-*bor-like*

Se seleccionaron transformantes ampicilinas resistentes lac⁻ como colonias blancas en AN mas Xgal. Estas se sembraron en 3 ml de caldo nutritivo con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron en agitación constante a 350 rpm a 37° C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el ADN plasmídico de las colonias bacterianas seleccionadas, mediante el protocolo de miniprep, modificado por Birnboim y Doly (1979) y Ish-Horowicz y Burke (1981) como se describe a continuación:



- **1.-** Se centrifugaron las bacterias crecidas en el caldo nutritivo a 14000 rpm durante 5 min. desechándose el sobrenadante.
- **2.-** La pastilla bacteriana se resuspendió en 100 μ l de Solución 1 (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) por vigoroso vortexeo.
- **3.-** Se adicionó 200 μ l de la Solución 2 (0.2 N NaOH y 10% SDS) y se mezcló el contenido por inversión, cinco veces rápidamente, de modo que la superficie del tubo tuviera contacto con la solución.
- **4.-** Posteriormente se agregaron 150 μ l de la Solución 3 (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H₂O), agitándose el tubo en posición invertida por 10 seg. para distribuir la solución a través de el lisado bacteriano. La mezcla se colocó en hielo durante 5 min.
- **5.-** Transcurrido el tiempo el lisado se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. transfiriéndose el sobrenadante a otro tubo.
- **6.-** Posteriormente se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo, mezclándose vigorosamente y centrifugándose a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo.
- **7.-** El sobrenadante se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándose a temperatura ambiente por 5 min. para posteriormente centrifugar a 14000 rpm durante 5 min. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió al final en 50 μ l de agua desionizada estéril. La calidad y concentración del DNA extraído se observó en un gel de agarosa al 1%.



Análisis de restricción para seleccionar colonias positivas que contuvieran el plásmido pCR 2.1-*bor-like*.

Se tomaron 5 μ l de DNA plasmídico obtenido de ensayos de miniprep y se digirieron con 2 u de la enzima *Eco RI* (New England Biolabs) durante una hora a 37°C. Los fragmentos de la digestión se observaron en un gel de agarosa al 1.5%.

Secuenciación de los genes *bor-like*

Unas vez seleccionadas las clonas que contenían el plásmido pCR 2.1-*bor*, se obtuvieron las secuencias de los putativos “*bor-like*” clonados, utilizando un secuenciador automático Genetic Analyzer Mod. 3100, la química de secuenciación fue ABI Prism BigDye Terminator Chemistry y se realizó en el laboratorio de secuenciación de la UBRIPO, FES Iztacala, UNAM, utilizándose los primers T7 promoter y M13 Reverse. Todas las secuencias fueron realizadas por duplicado para confirmar la integridad de la reacción.

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa Blast. Se realizaron fenogramas con las secuencias obtenidas; esto con el fin de determinar las posibles relaciones filogenéticas entre ellas.



RESULTADOS.

Obtención de stocks de fagos.

Con la técnica utilizada para la generación de stocks de cada uno de los fagos, se logró obtener una cantidad considerable de ufp, ya que este primer paso es un requisito indispensable para la obtención de una gran cantidad de DNA fágico necesaria para la realización de los PCR.

Extracción de DNA fágico

Mediante la técnica empleada, se obtuvo y purificó el DNA de cada uno de los ocho fagos utilizados en este trabajo. Para determinar la calidad y concentración del DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio. Se corrieron alícuotas de 5 μ l para cada una de las muestras. Como se muestra en la figura 10, el DNA fue extraído en buenas condiciones ya que se observa íntegro y sin la presencia de ARN. Para calcular la concentración de DNA de las muestras, se corrió en el gel una alícuota de un marcador de peso molecular, de concentración conocida, a partir del cuál se dedujo la concentración de las muestras, de acuerdo a la intensidad de la banda en el gel. Cabe mencionar que se observó una ligera variación en el tamaño de los cromosomas de los fagos, esto debido a la diferente migración que tuvieron en el gel. (figura 10).

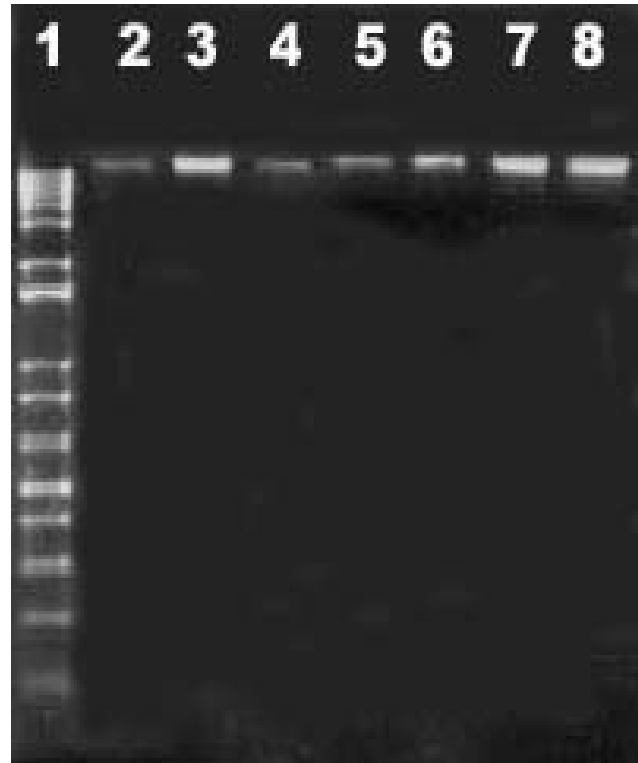


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en el que se muestra la extracción de DNA de los fagos utilizados. Carriles de izquierda a derecha: 1) MWM escalera 1 kb, 2) fago mEp 506, 3) fago mEp 038, 4) fago mEp 460, 5) mEp 064, 6) mEp 123, 7) mEp 173 y 8) fago 933W. 120 volts, 94 mA, 35 min. Buffer TBE 0.5X

Amplificación de Secuencias Homólogas al gen *bor*.

Debido a que el gen *bor* de λ le confiere resistencia al suero a *E. coli*, y de esta manera le confiere cierta ventaja selectiva tanto a la bacteria como al mismo bacteriófago, es muy probable que se encuentre diseminado en otros colifagos silvestres. Para determinar si los bacteriófagos utilizados en este trabajo contenían secuencias homólogas al gen *bor*, se utilizó una muestra de DNA, extraída de cada uno de los fagos, para utilizarla como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando como cebadores los primers diseñados para amplificar dicho gen. Los productos obtenidos para este gen se



analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (figura 11). Como control positivo se utilizó DNA de λ (Sigma Chemical Company).

En todos los fagos, a excepción de mEp 506, mEp 173 y mEp 064, se obtuvieron productos de amplificación (figura 11). Como se puede observar en la figura 11 todas las bandas amplificadas aparentemente son del mismo tamaño que el amplicado en el control (DNA λ), ya que la migración de cada una de ellas es exactamente la misma. Este resultado indica que los genes *bor-like* obtenidos mediante PCR son similares en tamaño al gen *bor* de λ .

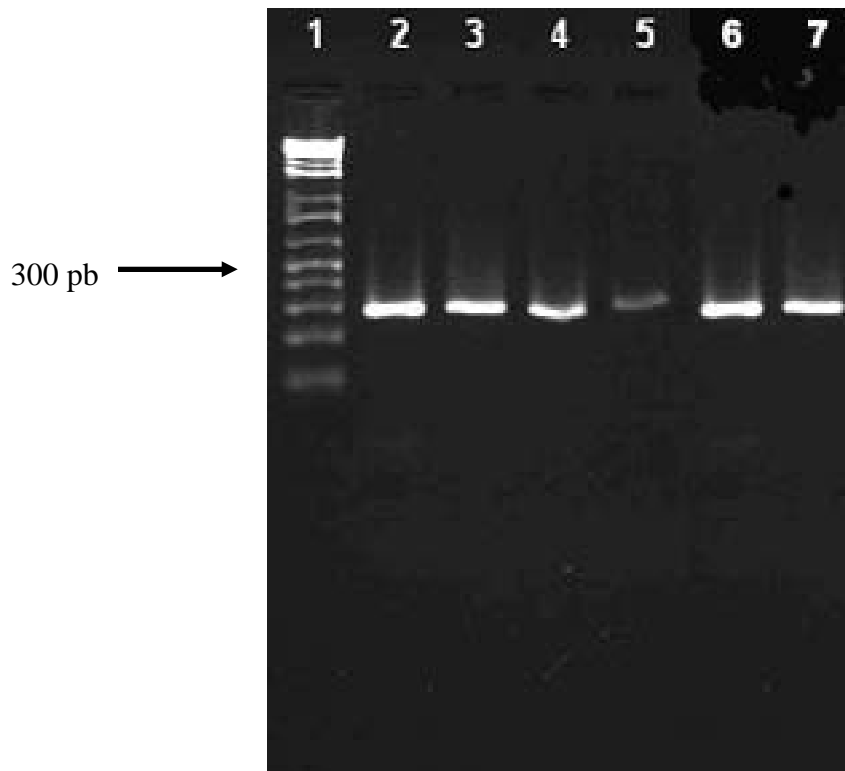


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carriles de izquierda a derecha: 1) MWM 2 kb, 2) λ *bor*, 3) mEp 460 *bor* like, 4) mEp 038 *bor* like, 5) mEp 123 *bor* like, 6) 933W *bor*-like, 7) Stx1 *bor*-like. 120 volts, 94 mA. 40 min. Buffer TBE 0.5X.



Para confirmar que en los fagos mEp 506,173 y 064 no se encontraban genes homólogos a *bor*, se modificó la temperatura de alineamiento del PCR hasta 50° C, esto con el fin de observar que la amplificación fuese negativa debido a que los fagos no tuvieran un segmento homólogo a *bor* en su cromosoma y no porque las condiciones de alineamiento de los primers fueran incorrectas. Tampoco en estas condiciones se obtuvieron amplificadas.

Clonación de los *bor*-like en el plásmido pCR2.1 y transformación de *E. coli* TOP10.

Con los productos que se obtuvieron mediante PCR, se prosiguió a clonarlos, por separado, en el plásmido pCR 2.1. Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar a *E. coli* TOP10. Una vez seleccionadas las clonas candidatas, se extrajo DNA plásmidico de cada una de ellas (figura 12).

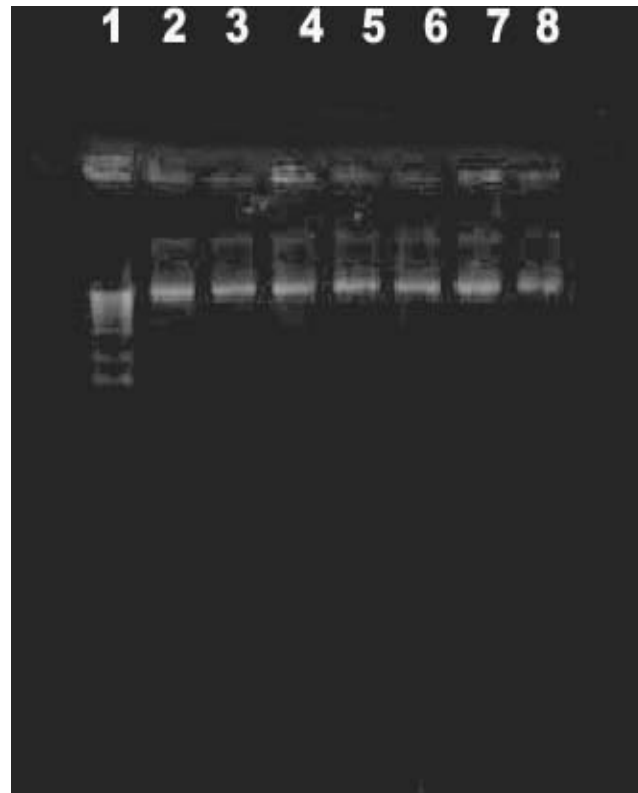


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA plasmidico (pCR2.1bor-like) . Carriles de izquierda a derecha: 1) MWM 1 kb, 2) *C2 mEp 123, 3) C5 mEp 460, 4) C23 mEp 038 5) C14 fago 933W 6) C16 fago Stx1, 7) C10 mEp 064 y 8) C15 mEp 506. 120 volts, 94 mA, 35 min. Buffer TBE 0.5X *Clona.

Una vez que se seleccionaron las clonas, se confirmó que el inserto “bor-like” se encontrara en el plásmido, para lo cual se liberó el fragmento de aproximadamente 300 pb con la enzima de restricción *Eco RI* (figuras 13 y 14).

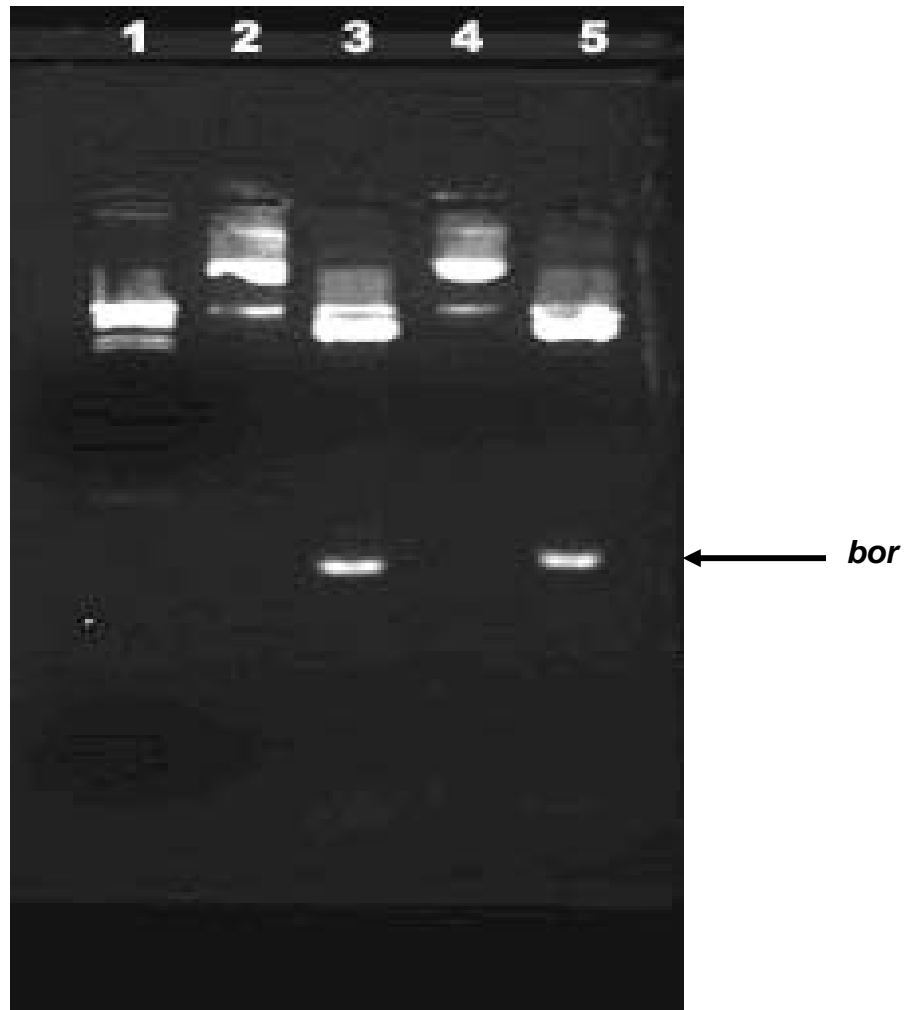


Fig. 13 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carriles de izquierda a derecha: 1) MWM 1 kb, 2) plasmido pCR2.1- *bor*933w-like sin cortar, 3) plasmido pCR2.1- *bor*933w-like cortado con EcoRI 4) plasmido pCR2.1- *borm*Ep123-like 5) plasmido pCR2.1- *borm*Ep123-like cortado con EcoRI. **120 volts, 94 mA, Buffer TBE 0.5X 40 min.**

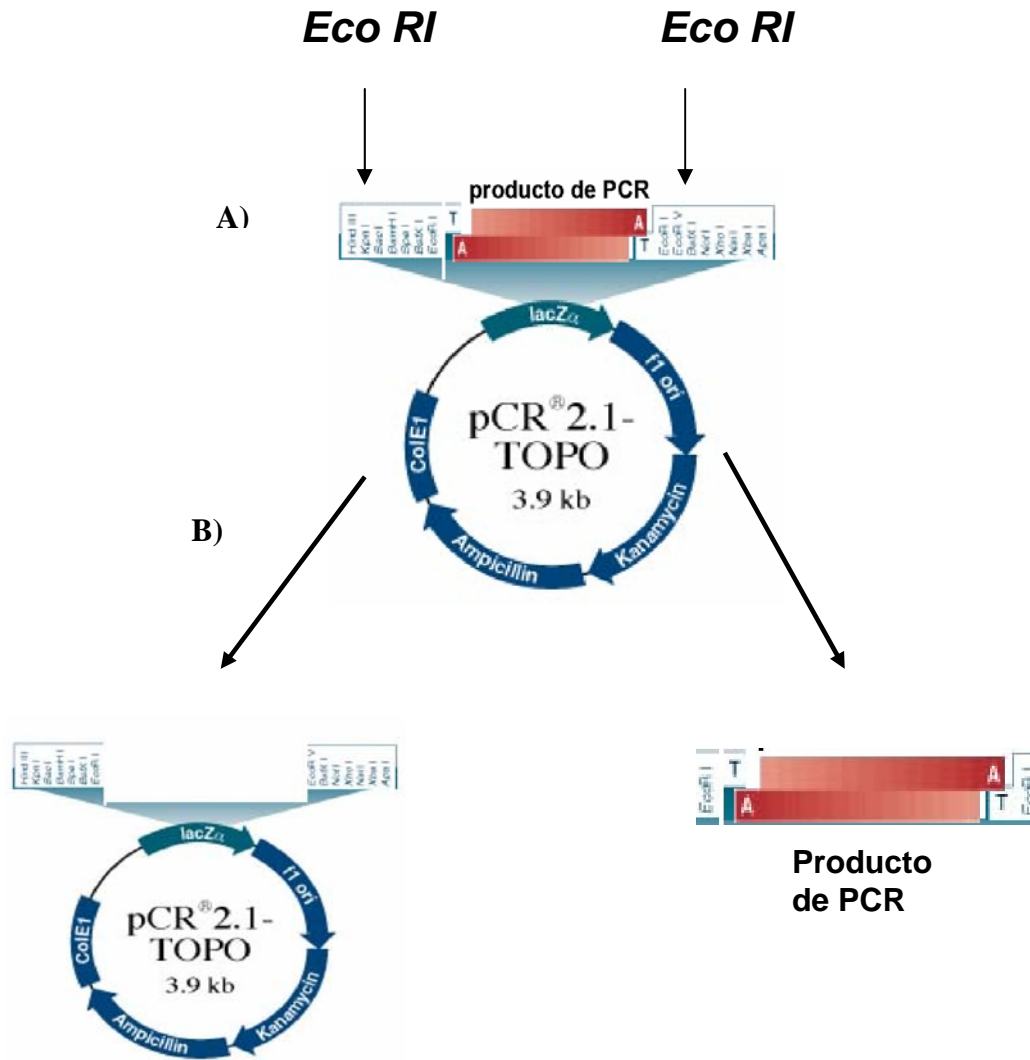


Fig. 14. Liberación de los productos de PCR del plásmido pCR 2.1. En la parte superior de la figura (A) se muestra el esquema del plásmido pCR 2.1 donde se indican los sitios de restricción para la enzima *EcoRI*. (B) Se muestran los productos de la digestión: plásmido sin inserto y el producto de PCR.

Una vez que se seleccionaron las clonas que contenían el plásmido mas el inserto, estos se mandaron secuenciar al laboratorio de secuenciación de la UBRIPO, FES Iztacala, UNAM, utilizándose un secuenciador automático Genetic.



Una vez obtenidas las secuencias de los productos de amplificación, se compararon por alineamiento en computadora con la secuencia de λ *bor*, juntas y por grupo (Multialin Interface Software. Corpet F, 1988), como se muestra en las figura 15, 16 y 17.

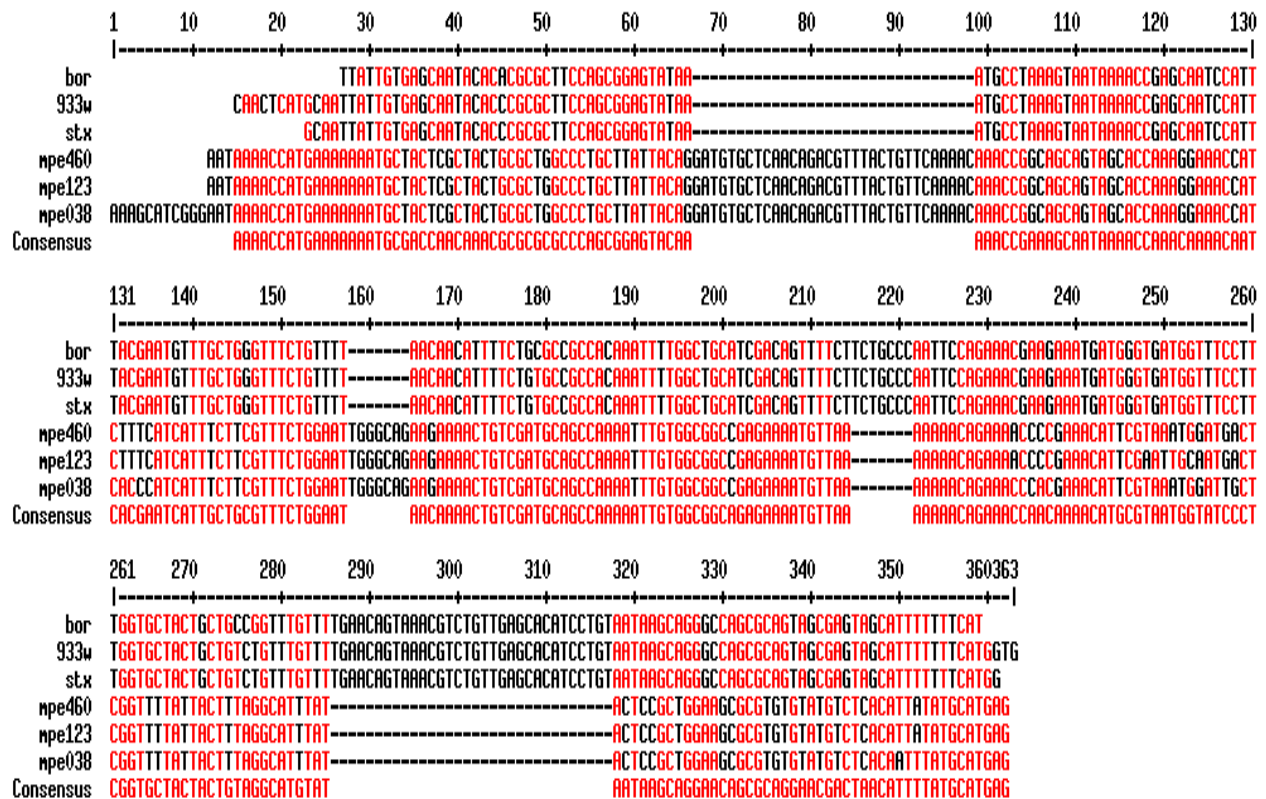


Fig. 15. Alineamiento de las secuencias “bor-like”. Las regiones de color rojo indican alto índice de homología en los distintos clusters o agrupamientos (>90%) y las regiones en color negro, bajo índice de homología (>1%). Las líneas punteadas indican gaps en el cluster.

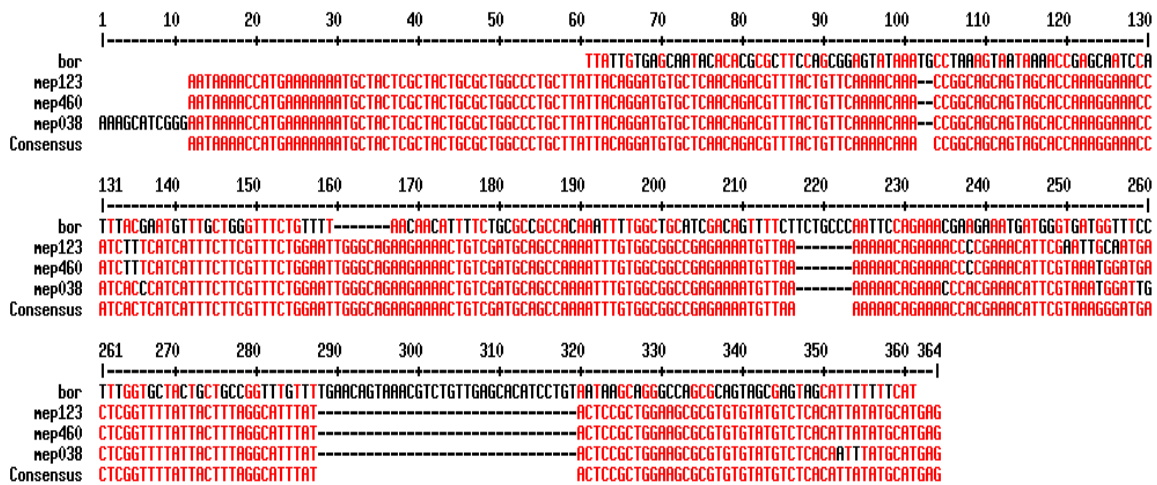


Figura 16. Alineamiento de las secuencias *bor*-like mEp's. Las regiones de color rojo indican alto índice de homología en los distintos clusters o agrupamientos (>90%) y las regiones en color negro, bajo índice de homología (>1%). Las líneas punteadas indican gaps en el cluster.

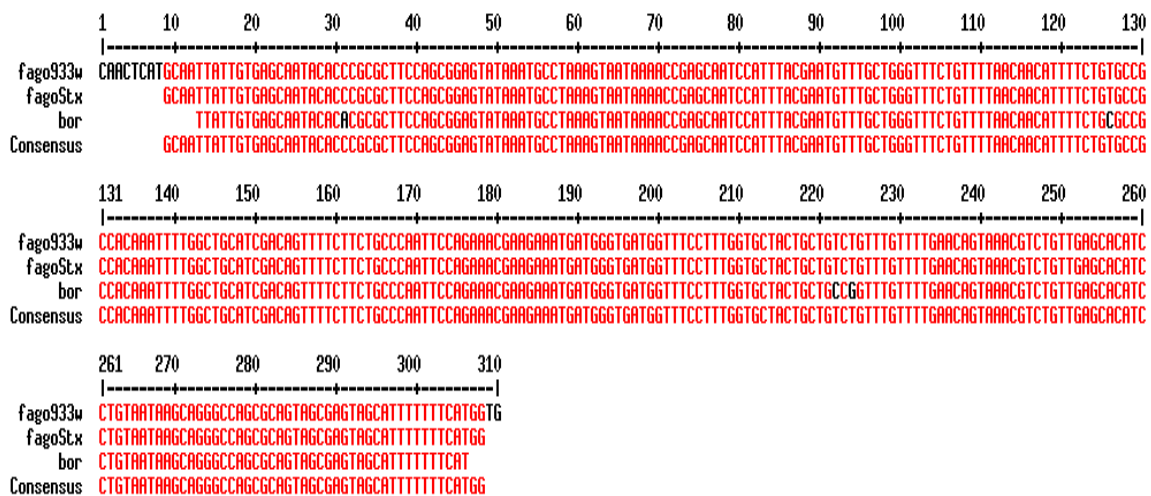


Figura 17. Alineamiento de las secuencias *bor* 933w y Stx. Se puede observar que las secuencias son 100% homólogas al gen *bor* de λ .



Las interacciones a nivel de similitud y divergencia de cada una de las secuencias entre sí se muestran en la matriz contenida en la tabla 2.

Percent Similarity									
	1	2	3	4	5	6	7		
1		94.6	96.8	26.1	30.0	25.4	23.0	1	038.SEQ
2	3.5		97.8	25.5	30.0	26.0	25.3	2	123.SEQ
3	2.9	0.6		25.2	30.0	25.6	25.0	3	460.SEQ
4	41.3	42.5	41.7		99.2	77.1	100.0	4	933.SEQ
5	45.4	45.4	45.4	0.8		98.3	99.2	5	BOR2.SEQ
6	42.1	43.9	43.3	13.5	0.0		79.3	6	ISS.SEQ
7	41.2	42.4	41.7	0.0	0.8	12.3		7	STX.SEQ
	1	2	3	4	5	6	7		

Tabla 2. Se muestran los porcentajes de similitud entre cada una de las secuencias encontradas en este trabajo.

Árbol filogenético de las secuencias “bor-like”.

Con el propósito de establecer relaciones evolutivas entre las secuencias obtenidas, se prosiguió a elaborar un árbol filogenético, por medio del programa DNA Weighted como se muestra en la figura18.

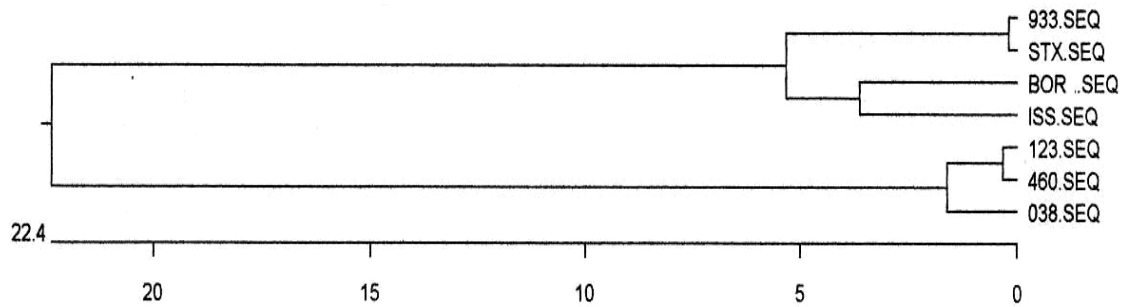


Figura 18. Árbol filogenético de la familia *bor*-like, en este también se incluye la secuencia del gen *iss*

Secuencias regulatorias del gen *bor* del bacteriófago λ .

Con el fin de iniciar el estudio de los probables mecanismos de regulación de la expresión del gen *bor*, se llevó a cabo el análisis *in silico* de una región intergénica ubicada río arriba de este gen, con el propósito de identificar las secuencias regulatorias, las cuales se muestran en la figura 19.

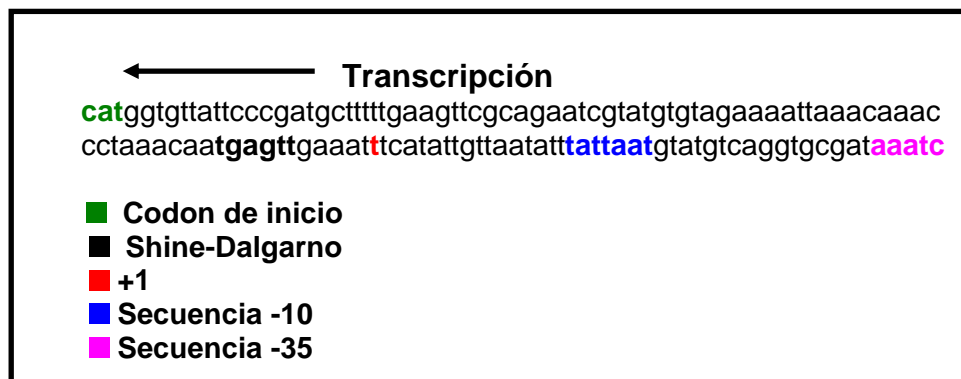


Figura 19. Secuencias regulatorias encontradas en la región intergénica ubicada río arriba del gen *bor*.



Así mismo por medio del programa rna Fold (RNA secondary Structure prediction Software; Michael, Z. 2004) se llevó a cabo la búsqueda de un posible terminador de la transcripción (figura 20).

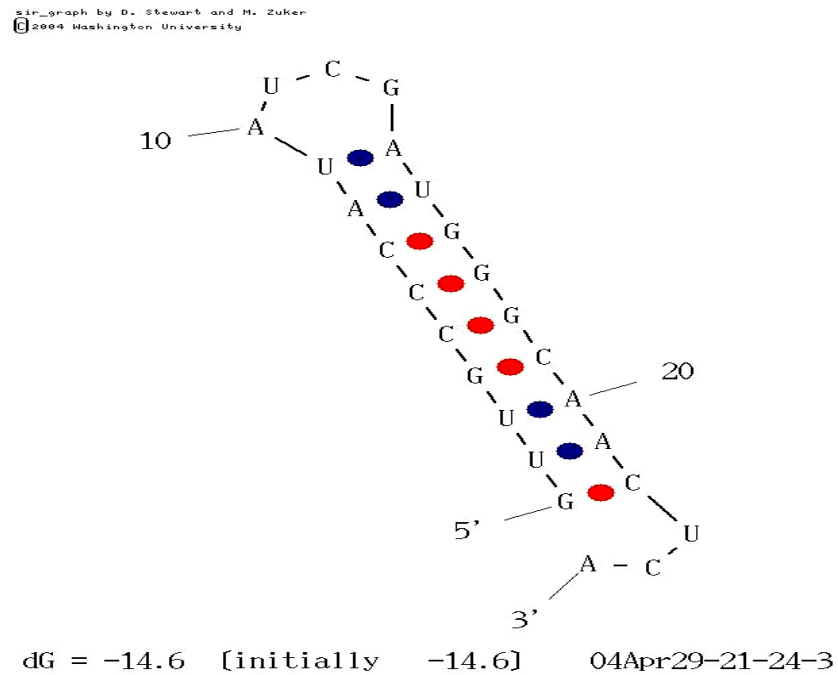


Figura 20. Putativo terminador de la transcripción del gen *bor* localizado en la región intergénica



DISCUSIÓN.

No obstante que el bacteriófago λ es uno de los fagos más extensamente estudiados, algunas de sus características no han sido entendidas por completo. Uno de los aspectos más oscuros es el relacionado con la función de los llamados genes accesorios, que se encuentran en regiones del genoma dispensables para su crecimiento lítico en condiciones de laboratorio. Uno de estos genes accesorios es *bor*, cuya posesión por una lisógena incrementa significativamente la sobrevivencia bacteriana en presencia de suero (Barondess y Beckwith, 1990). La demostración de que un gen viral “accesorio” confiere una ventaja selectiva a su lisógena conduce a pensar que los fenómenos de conversión lisogénica deben ser muy frecuentes en la población bacteriana y que los genes responsables deben estar representados en múltiples bacteriófagos.

En este trabajo demostramos que los fagos mEp 123, mEp 038, mEp 460, 933W y Stx1 poseen genes homólogos al gen *bor* (figura 11). Este resultado sugiere un alto grado de conservación de este gen en los colifagos temperados.

Es probable que las lisógenas para estos fagos, portadores de *bor*, sean más virulentas que las cepas no lisógenas ya que, como se mencionó en la introducción, *bor* es homólogo al locus *iss*, y se ha demostrado que un fragmento subclonado que contiene a *iss* confiere un incremento de 100 veces en la virulencia de *E. coli* para pollos (Binns, M.M., Davies, D., and Hardy, K., citado en Barondess, 1990).



De acuerdo con los índices de homología de las secuencias obtenidas (Tabla 2), se puede observar que las secuencias más cercanas a *bor* λ son *bor*933w-like y *bor*Stx1-like, con el mismo porcentaje de similitud. Cabe resaltar que la secuencia *bor*Stx1-like, proviene de un fago temperado que infecta a *E. coli* enterotoxigénica. Este fago codifica para la toxina Shiga, causante de diarrea; esto aunado a la secuencia *bor*-like hallada en su cromosoma, puede resultar de importancia clínica y selectiva tanto para el fago como para la bacteria. Las secuencias con menos índice de homología fueron: *bom*Ep123-like, *bom*Ep038-like y *bom*Ep460-like, las tres con el mismo porcentaje (Tabla 2). Por otro lado el subgrupo conformado por *bom*Ep038-like, *bom*Ep123-like y *bom*Ep460-like muestra ser el más alejado filogenéticamente de *bor* λ (figura 17), de estas la secuencia *bom*Ep038-like es la más alejada de todas. El otro subgrupo está conformado por *bor*-933W-like y *bor*Stx1-like, el cual muestra ser el más emparentado filogenéticamente con *bor* λ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la tabla de índices de homología (tabla 2).

En cuanto a la similitud entre las secuencias encontradas en este trabajo, se determino que las secuencias *bor*-933W-like y *bor*Stx1-like, presentan un índice de homología del 100% (tabla 2), de esta manera se sugiere que se trata del mismo gen presente en ambos fagos. En cuanto a las secuencias *bom*Ep123-like y *bom*Ep460-like se observa un índice de homología del 97.8%. En los alineamientos de estas secuencias se observa que *bom*Ep038-like, *bom*Ep123-like y *bom*Ep460-like muestran 2 gaps que no comparten con *bor*-933W-like y



borStx1-like (figura 15); el primero de ellos se localiza al inicio de las secuencias y abarca aproximadamente 30 pb, el segundo a la mitad de las secuencias siendo de 7 pb. Por lo contrario *bor-933W*-like y *borStx1*-like junto con *bor* λ , comparten 2 gaps que no se encuentran en los “*bors* mEp”: el primero a la mitad de las secuencias de 10 pb. y el segundo al final de ellas de aproximadamente 30 pb.

Lo anterior nos permite sugerir que posiblemente los *bor*-like encontrados en los fagos utilizados en este trabajo codifiquen para una proteína similar a Bor; es decir que confieran un fenotipo de resistencia al suero para sus respectivas lisógenas y que ello incremente su virulencia. Para confirmar esta predicción sería necesario comparar la susceptibilidad al suero, y la virulencia en un modelo de infección, de *E. coli* lisógenas para estos fagos en comparación con la isogénica no lisógena.

Regulación de la expresión de *bor*.

El gen *bor* se localiza a la izquierda de un gen putativo que codifica para una proteína de la cápside de λ ; este gen se transcribe de derecha a izquierda. Con base en esto, se logró determinar una región intergénica de 289 nucleótidos, contando a partir del nucleótido inmediato siguiente al de término del gen putativo, hasta al inmediato anterior al codón de inicio de *bor*. En esta región intergénica se identificaron regiones consenso similares a las reportadas para las secuencias Shine-Dalgarno, TATA y región -35; además de un RNA leader de 82 b (figura 19).



Por otro lado en la región intergenica ubicada justo al término del gen *bor* se logró determinar un posible terminador de la transcripción de *bor* (figura 20). Estos resultados sugieren que *bor* se expresa en la misma dirección que el gen putativo para la proteína de la cápside de λ .

En conclusión, en este trabajo reportamos la presencia de genes homólogos a *bor* en 5 colifagos; así como la localización en el DNA de λ de: (1) un probable promotor σ^{70} a partir del que se transcribe *bor*, (2) la región leader de *bor* con la secuencia Shine-Dalgarno y, (3) un probable terminador de la tra



BIBLIOGRAFÍA.

- Allan, C. 2003. Prophage insertion sites. *Res. Microbiol.* 154: 277-282.
- Barnes, G., M. y Weiss, A., A. 2003. Activation of the complement cascade by *Bordetella pertusis*. *FEMS Microbiol.* 220: 271-275.
- Barksdale, L. y Arden, S. B. 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Ann. Rev. Microbiol.* 28: 265-299.
- Barondes, J. J. y Beckwith, J. 1995. *bor* gene of bacteriophage λ_2 involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein J. *Bacteriol.* 177: 1247-1253.
- Barondess, J.J. & J. Beckwith. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature* 346: 871-874.
- Bergh, Q., K., Y., Borsheim, G., B. y Heldal M. 1989. High abundance of viruses found an aquatic environments. *Nature.* 340: 467-468.
- Bishai; W. R. y Murphy, J. R. 1988. Bacteriophage gene products that cause human disease. En: *The bacteriophages*, Vol. 2. pp. 683-725. Calendar, R. (ed). Plenum Press, New York.
- Bliska, J., B. y Falkow, S. 1992. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3561-3565.
- Carbonetti, N., Simnad, V., Elkins, C. y Sparling P., F. 1990. Construction of isogenic gonococci with variable porin structure: effects on susceptibility to human serum and antibiotics. *Mol. Microbiol.* 4: 1009-1018.
- Clark, C. A. Beltrame, J. y Manning, P. A. 1991. The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6. *Gene.* 107: 43-52.
- Cheetham, B., F. y Kantz M., E. 1995. A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 18: 201-208.
- Coleman, D., Sullivan, D. J., Rusell, R. J., Arbuthnott, J. P. Carey, B. F. y Pomeroy, H. M. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen Microbiol.* 135: 1679-1697.



- David K. R. Karalouis, Sita Somara, David R. Maneval Jr., Judith A. Jonson y James B. Kaper. 1999. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 399: 375-379.
- D' Herelle, F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 165 : 373-375.
- Danovaro, R., A., Dell' A., A., Trucco, M., S. y Vanucci, S. 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1384-1387.
- Echols, H. & L. Green, 1971. Establishment and maintenance of repression by phage lambda: the role of cl, cII and cIII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2190-2194.
- Echols, H. 1972. Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Ann. Rev. Gen.* 6: 157-190.
- Echols, H. & Guarneros, G. 1983. Control of integration and excision. En *Lambda II*. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl & R.A. Weisberg (eds). p. 75-92, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Edward A. Miao y Samuel I. Miller. 1999. Bacteriophages in the evolution of pathogen-host interactions. 96: 9452-9454.
- Elaine R. Delicato , Benito Guimarães de Brito ,Luis Carlos J. Gaziri , Marilda C. Vidotto. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94: 97-103.
- Ellis, M. G., Arp, L. H., y Lamont, S. J. 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* from turkeys. *Am. J. Vet. Res.* 49: 2034-2037.
- Ellis, E. L. y Delbruck M. 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22: 365-384.
- Fantinatti, F., Silveira, W. D. y Castro, A. F. P. 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemia *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41: 75-86.
- Franklin, N., C. y Bennet G., N. 1979. The N protein of bacteriophage lambda, defined by its DNA sequence, is highly basic. *Gene* 8: 107-119.
- Freeman, V. J. 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae* *J. Bacteriol.* 61: 675-688.



- Friedman, D.I. & L.S. Baron, 1974. Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage λ . *Virology* **58**:141-146. Friedman, D.I., M. Baumann & L.S.
- Baron. 1976. Cooperative effects of bacterial mutations affecting λ N gene expression I. Isolation and characterization of a *nusB* mutant. *Virology* **73**:119-127.
- Friedman, D.I., A.T. Schauer, M.R. Baumann, L.S. Baron & S. Adhya, 1981. Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:1115-1122.
- Gottesman, M., E., Adhya, S., y Das, A. 1980. Transcription antitermination by bacteriophage lambda N gene product. *J. Mol. Biol.* **140**: 57-75.
- Hershey, A., D., Burgi, E. y Ingraham, L. 1963. Cohesion of DNA molecules isolated from phage lambda. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **49**: 748-755.
- Heffernan, E., J., Harwood, J., Fierer, J. y Guiney, D. 1992. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* y *ail*. *J. Bacteriol.* **174**: 84-91.
- Heffernan, E., J., Reed, S., Hackett, J., Fierer, J., Roudier, C. y Guiney, D. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. *J. Clin. Invest.* **90**: 953-964.
- Herskowitz, I. & D. Hagen, 1980. The lysis-lysogeny decision of phage λ : Explicit programming and responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* **14**:399-445.
- Ibrahim, S. D. y Alan, J. F. 2000. Survival of avian strains of *Pasteurella multocida*. In chicken serum. *Vet. Microbiol.* **71**: 153-161.
- Ike, K., Kawahara, K., Danbara, H. y Kume, K. 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* by conjugative 100-megadalton plasmid. *J. Vet. Med. Sci.* **54**: 1091-1098.
- Little, J., W. y Mount, D., W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell.* **29**: 11-22.
- Merino, S., Noguerras, M., N., Aguilar, A., Rubires, X., Alberti, S., Benedi, V., J. y Tomas, J., M. 1998. Activation of the complement classical pathway (C1q binding) bt mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein. *Infect. Immun.* **66**: 3825-3831.
- Mintz, C., S., Arnold, P., I., Jonson, W. y Schultz, D., R. 1995. Antibody-independent binding of complement C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **63**: 4939-4943.



- Miller, H.I. & H. A. Nash, 1981. Direct role of the *himA* gene product in phage λ integration. *Nature* 290:523-526.
- Nida, S. K. y Ferreti, J. J. 1982. Phage influence on the synthesis of extracellular toxins in group A Streptococci. *Infect. Immun.* 36: 745-750.
- Ngeleka, M., Kwago, J. K. P., Whitw, D. G., Whittam, T. S., Riddell, G., Goodhope, R., Potter, A. y Allan, B. 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* 64: 3118-3126.
- Ogierman, M., A. y Manning, P., A. 1992. TCP pilus biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: gene sequence of *tcpC* encoding an outer membrane lipoprotein. *FEMS. Microbiol. Lett.* 76: 179-184.
- Parreira, V. R., Arns, C. W. y Yano, T. 1998. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with Swollen Head Syndrome. *Avian Pathol.* 27: 148-154.
- Parsot, C., Taxman, E. y Mekalanos, J., J. 1991. ToxR regulates the production of lipoproteins and the expression of serum resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1641-1645.
- Paul, J., H. 1999. Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 45-50.
- Pfaff-McDonough, S., J. Home, S., M., Giddings, C., W., Ebert, J., O., Doetkott, C., Smith, M., H. and Nolan, L., K. 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds with colibacillosis. *Avian Dis.* 44: 23-33.
- Pierson, D., E. y Falkow, S. 1993. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect. Immun.* 61: 1846-1852.
- Rizvi, M., K., S. 2003. Serum resistance of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection and diarrhea in relation to alpha haemolysin production and O type. *Indian J. Pathol Microbiol.* 46(3): 504-6
- Roberts, J., W. 1969. Termination factor for RNA synthesis. *Nature.* 224: 1168-1174.
- Rohwer, F. y Edwards R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* 184(16): 4529-4535.
- Rosenberg, M., D., Shimatake, H., Brady, C. y Wulff, D., L. 1978. The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in the phage λ . *Nature.* 272: 414-423.



- Russel, M. 1991. Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol.* 5 : 1607-1613.
- Salstrom, J., S. y Szybalski. 1978. Coliphage ϕ nutL⁻ : A unique class of mutants defective in the site of N product utilization for antitermination of leftward transcription. *J. Mol. Biol.* 124: 195-222.
- Szybalski, E. y Szybalski, W. 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7: 217.
- Taylor, P., W. 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83.
- Vaca, P. S., García, G. O., y Paniagua, C. G. 1997. The *lom* gene of bacteriophage ϕ is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 129-132.
- Virginia L. M., Karen B. B., Gerhard H., Briana M. Young y Marian R. W. 2001. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol. Microbiol.* 41(5): 1053-1062.
- von Heijne, G. 1990. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115: 195-201.
- Walport, M., J. 2001. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 1058-1066.
- Wilhelm, S., W. y Suttle, C., A. 1999. Virus and nutrient cycles in the sea. *Bioscience.* 49: 781-783.
- Wooley, R. E., Spears, K. R., Brown, J., Nolan, L. K. y Fletcher, O. J. 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 36: 679-684.
- Young, E., T. y Sinsheimer, R., L. 1964. Novel intra-cellular form of lambda DNA. *J. Mol. Biol.* 10: 562-564.