

28
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

AISLAMIENTO DE COLIFAGOS TEMPERADOS SILVESTRES QUE AUMENTAN LA ADHESION DE *Escherichia coli* K12 A CELULAS BUCEOPITELIALES HUMANAS.

T E S I S

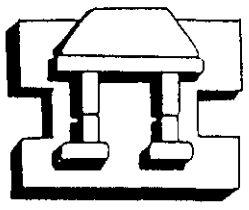
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EDMUNDO FLORES RIVERO

DIRECTOR DE TESIS M en C. SERGIO VACA PACHECO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO DE MEXICO

1999

17/07/99

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A DIOS: por regalarme el don de la vida.

A MIS PADRES: *Felipa y Juan.*

Por el inmenso amor y respeto que siempre les he tenido,
para ellos mi más sincero agradecimiento por su cariño y
apoyo en todos los momentos de mi vida.

Muchas Gracias.

A MIS HERMANOS: *Jose, Margarita, Bertha, Paula, Antonia y Ramón.*

Por ser parte indispensable de mi vida y por el incondicional
apoyo brindado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Al *M en C Sergio Vaca Pacheco* con especial énfasis, por dedicar importante parte de su tiempo en mi formación profesional, por su inigualable asesoría, consejos, apoyo, paciencia y confianza, que fueron de vital importancia para la realización de este trabajo.

Al *Dr. Diego Arenas Aranda* por su invaluable apoyo, sus consejos y enseñanza, que me permitió seguir adelante.

Al *M en C Ramón V. Moreno T.* por su motivación de este trabajo.

A los revisores de mi trabajo: *Dr. Diego Arenas A, M en C. Sergio Vaca, M en C Ramón V. Moreno T, Biol. Elias Piedra I. y Biol. Irma E. Dueñas G.* por sus sugerencias y comentarios que permitieron enriquecerlo.

A la *Dra. Valeria Souza del Centro de Ecología UNAM* por proporcionarnos la colección de cepas bacterianas.

A *Octavio García González* por su ayuda y asesoría en la técnica de PCR.

A mis amigos *Nora, Luz, Paty, Fernando, Leobardo y Omar*, con especial afecto por sus gratos momentos de amistad y apoyo.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la ENEP Iztacala, bajo la dirección del M. en C. Sergio Vaca Pacheco, y con financiamiento de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) .

PROYECTO DGAPA IN206597.

INDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	4
INTRODUCCION	5
Adhesión bacteriana a epitelios asistida por profagos	9
OBJETIVO	11
MATERIAL Y METODOS	11
Medios de cultivo y soluciones	11
Bacterias y bacteriófagos y DNA λ	12
Aislamiento de fagos	12
Obtención de lisados	13
Titulación de lisados	13
Obtención de lisógenas	14
Determinación de la inmunidad de lisógenas para fagos silvestres	14
Adhesión a células bucoepiteliales humanas (CBH)	15
Extracción de DNA de bacteriófagos	16
Detección de las secuencias homóloga al gen <i>lom</i>	18
Amplificación del gen <i>lom</i> de λ por PCR	18
RESULTADOS	21
DISCUSION Y CONCLUSION	27
BIBLIOGRAFIA	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa genético del bacteriófago λ	6
Figura 2	Genes accesorios <i>lom</i> y <i>bor</i> del bacteriófago λ	8
Figura 3	Arbol filogenético de los genes de la familia OMP	9
Figura 4	Secuencia nucleotídica de gen <i>lom</i> de λ	20
Figura 5	Amplificación de los genes <i>lom</i> y <i>bor</i> de λ	25
Figura 6	Amplificación del gen <i>lom</i> -like en colifagos silvestres	26

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Familia de genes OMP	9
Tabla 2	Grupo de inmunidad de los fagos silvestres	23
Tabla 3	Efecto de colifagos silvestres sobre la adhesión de <i>E. coli</i> . a CBH	24

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos son virus parásitos intracelulares obligados que infectan a bacterias. Su parasitismo es a nivel genético ya que para su multiplicación intracelular requieren de la maquinaria bacteriana de replicación, transcripción y traducción. Los bacteriófagos se dividen en dos tipos, según su ciclo de vida: líticos y temperados. Los líticos son aquellos que matan a toda bacteria que infectan, liberando, en promedio, alrededor de 200 fagos por cada bacteria infectada. Los temperados pueden seguir cualquiera de dos vías mutuamente excluyentes: la lítica o la lisogénica (Echols, H., 1972). Debido a que cuando los bacteriófagos se multiplican en las bacterias lisas, se podría pensar que en algún momento podrían acabar con ellas, condenándose a desaparecer. No obstante, fagos y bacterias establecen varios equilibrios presa-predador (Echols, H., 1979) y en ocasiones son benéficos para las bacterias, a través del fenómeno de la conversión lisogénica, que consiste en la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediada por un profago (Barksdale, L. & S.B. Arden, 1974). La conversión lisogénica sólo puede llevarse a cabo por los fagos temperados, capaces de lisogenizar. El bacteriófago temperado mejor estudiado es el fago λ , que infecta a *Escherichia coli*.

λ está compuesto por aproximadamente 50% de proteínas y 50% de DNA de doble cadena. El tamaño de su genoma es de 48,502 pb, que corresponden a una masa de 32×10^6 Da. La molécula de DNA está contenida en una cápside icosaédrica de 0.055μ de diámetro que se encuentra unida a una cola tubular de 0.15μ de longitud. El DNA de λ posee extremos cohesivos de cadena sencilla (12 b) en ambos extremos 5' que le permiten circularizarse después de la inyección a la célula (Hershey, *et al.*, 1963; Young, E.T. & R.L. Sinsheimer, 1964). El genoma de λ expresa aproximadamente 50 proteínas (Szybalski, E. & W. Szybalski, 1979). Los genes de λ están agrupados como unidades funcionales, cuya localización en el genoma refleja su orden de expresión temporal (Figura 1).

Cabeza y cola		Recombinación				Regulación		Replic	Lisis		
Λ	J	b2	att	int	red	N	cI	OP	Q	S	R

Figura 1. 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 al bacteriano) y *cI* (el cual codifica al represor, que reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis).

Los genes de λ que no se requieren para lisis ni para lisogenia se denominan accesorios (Court y Oppenheim, 1983). Éstos se encuentran distribuidos en varias partes del genoma. El segmento mayor de DNA dispensable corresponde a 33% del genoma, entre el gen *J* y el gen *N* (ver figura 2). 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 delección de un segmento de 2.8 kb (delección *nin5*) en esta región no tiene efecto alguno sobre el desarrollo del fago. Por último, hasta hace poco no se habían localizado genes en las últimas 2 kb del extremo derecho del genoma de λ (a la derecha del gen *R*) (Hernández, V.J. *et al.*, 1985). Recientemente se ha demostrado que dos de los genes "accesorios" de λ : el gen *lom*, situado inmediatamente a la derecha

del gen *J*, y el gen *bor*, localizado a la derecha de *R* (Figura 2), se expresan en la lisógena y codifican para proteínas de membrana externa que están implicadas en la conversión de dos propiedades de virulencia: Bor en la resistencia al efecto bactericida del suero (Barondess y Beckwith, 1990) y Lom en la adhesión de la lisógena a células bucoepiteliales humanas (García, O. *et al.*, 1996., Vaca, S. *et al.*, 1997).

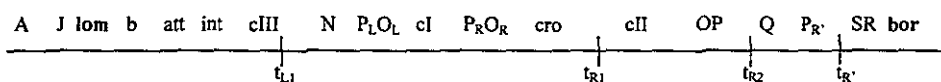


Figura 2. Localización de los genes "accesorios" *lom* y *bor* en el genoma de λ .

El gen *lom* fue descrito en 1979, y codifica para una proteína de 20.5 kDa que se localiza en la membrana externa de *E. coli* (Reeve, J.N. & J.E. Shaw, 1979). Este gen forma parte de una familia de cinco genes que codifican para proteínas de membrana externa. Esta familia incluye a los genes *rck* y *pagC* (Heffernan, E.J. *et al.*, 1992; Pulkkinen, W.S. & S.I. Miller, 1991) de *Salmonella typhimurium*, al gen *ail* de *Yersinia enterocolitica* (Miller, V.L. *et al.*, 1990) y al gen *ompX* de *Enterobacter cloacae* (Stoorvogel, J. *et al.*, 1991). Los genes *rck*, *pagC*, *ail* y *lom* confieren propiedades de virulencia (ver tabla 1), es de notar el hecho que el gen *ail* confiere además del fenotipo de invasión, el de adhesión, tal como el

gen *lom* (Vaca, S. *et al.*, 1997) el cual se ha propuesto como ancestro de la familia OMP (ver figura 3).

Tabla 1. Familia de genes OMP

Gen	Bacteria	Localización	Fenotipo	Referencia
<i>rck</i>	<i>S. typhimurium</i>	Plásmido	Resistencia al suero	Hackett <i>et al.</i> , 1987, Heffernan <i>et al.</i> , 1992.
<i>pagC</i>	<i>S. typhimurium</i>	Cromosoma	Virulencia en ratón	Miller, <i>et al.</i> , 1989.
<i>ail</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	Cromosoma	Adhesión e invasión	Miller, <i>et al.</i> , 1988, 1990.
<i>ompX</i>	<i>E. cloacae</i>	Cromosoma	?	Stoorvogel <i>et al.</i> , 1991.
<i>lom</i>	<i>E. coli</i>	Fago λ	Adhesión	García <i>et al.</i> , 1996, Vaca <i>et al.</i> , 1997.

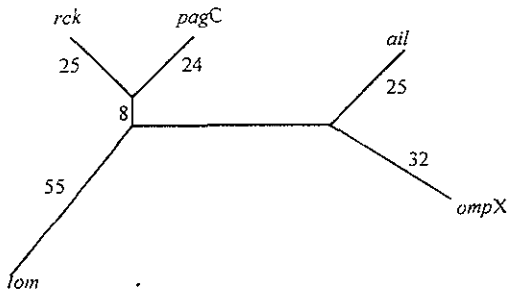


Figura 3. Árbol filogenético propuesto para los cinco miembros de la familia OMP. Basado en el análisis de las secuencias por computadora. Los números representan las distancias calculadas entre las secuencias de las proteínas. (Tomado de Heffernan *et al.*, 1992).

Adhesión bacteriana a epitelios asistida por profagos

La adhesión es la unión irreversible, relativamente estable, de las bacterias a una superficie. Esta es una importante propiedad de virulencia bacteriana, ya que es un pre-requisito para la colonización del hospedero.

Las adhesinas que median la unión a las superficies mucosas son los fimbriae o algunas proteínas de membrana externa codificadas por genes cromosómicos o plasmídicos (Harp, L.H. 1988).

Recientemente se ha reportado que el profago λ incrementa la adhesión de *E. coli* a células bucoepiteliales humanas y que este efecto se debe, probablemente, al gen *lom* (García, O. *et al.*, 1996, Vaca, S. *et al.*, 1997). Hasta donde sabemos, este es el segundo reporte de adhesión incrementada a células epiteliales mediada por un profago; el primer ejemplo lo constituyó el fago FIZ15 de *Pseudomonas aeruginosa* (Vaca, S. *et al.*, 1989).

Debido a que el gen *lom* de λ le confiere propiedades de virulencia a la lisógena (adhesión a epitelios), y al ser esto generalmente una ventaja selectiva para estas bacterias, es probable que estén altamente conservados en colifagos.

Objetivo.

El objetivo de este trabajo es aislar bacteriófagos temperados a partir de 300 cepas silvestres de *E. coli* con el propósito de detectar aquellos que incrementen la adhesión de su lisógena a células bucoepiteliales humanas y determinar si poseen una secuencia de DNA homóloga al gen *lom* del bacteriófago λ .

Material y métodos.

Medios de cultivo y soluciones.

Todos los medios utilizados para crecer las bacterias se obtuvieron de Merck y Bioxon de México. Estos fueron: Caldo nutritivo (CN), Agar nutritivo (AN), Caldo de soya y tripticasa (CST), Ágar de soya y tripticasa (AST). El agar suave (AS) para plaquear los fagos fue CN con 0.6% de agar bacteriológico. Los experimentos de adhesión se efectuaron en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.2 (Sigma Chemical Co.). Buffer TE (10 mM Tris HCl pH 8.5; 1 mM EDTA); Solución de precipitación :PEG8000 (Polietilenglicol 8000 al 10% en NaCl 2.5 M). SM (NaCl 5.85 g, agua 480.5 ml, ajustando a pH=7.4, después de esterilizar, se agregaron 5ml de Tris 1M, pH=7.4 y 2.5 ml de $MgSO_4$).

TBE10X (89mM Tris OH, 89mM ácido bórico, 2.5mM Na₂ EDTA, pH=8.3). Bromuro de Etidio 500ng/ml (Sigma Chemical Co.).

Bacterias , bacteriófagos y DNA de λ .

Las cepas de *E. coli* K12 utilizadas en este trabajo fueron C600 (F-*thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 λ -*) y C600(λ ⁺), así como el bacteriófago λ ⁺ (donadas por G. Guarneros, CINVESTAV, México, DF). El DNA de λ ⁺, y los deoxinucleótidos utilizados en los PCR, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por Farmacéuticos Lakeside S.A. de C.V.

Métodos

1. Aislamiento de fagos.

Los bacteriófagos se aislaron a partir de 300 cepas silvestres de *E. coli* (parte de la colección de la Dra. Valeria Souza, Centro de Ecología, UNAM), de origen humano.

Para aislar los fagos, cada cepa silvestre se creció en Caldo Nutritivo a 37°C con agitación (100 r.p.m.) toda la noche. El cultivo se centrifugó a 15,000 r.p.m./15 min, y el sobrenadante se goteó sobre un tapiz de la cepa C600 de *E. coli*.

Los bacteriófagos detectados se purificaron tres veces a partir del halo de lisis del tapiz mediante la obtención de placas aisladas picando la placa con un palillo estéril sobre un tapiz fresco de la cepa indicadora (C600).

2. Obtención de lisados:

De cada fago purificado se obtuvo un lisado de alto título (10^{10}) por infección de C600 en líquido hasta lisis.

Esto se hizo mezclando 1 placa de cada fago, en 10 ml de CN y 0.2 de E.coli C600, esta mezcla se incubó a 150 r.p.m./ 37°C, durante 3-5 h hasta lisis. Al término de ésta, se agregaron unas gotas de cloroformo y se incubó durante 15 minutos más, se centrifugó a 15,000 r.p.m./15 min, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril, y se almacenó a 4°C.

3. Titulación de lisados:

Se sembró una asada de C600 en CN en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se hicieron diluciones 10^{-3} , 10^{-6} y 10^{-7} de cada stock de fago. Se tomó 0.1 ml de cada dilución y se mezcló con 0.2 ml de C600 y 3 ml de agar suave, se agitó y se vació en una caja de AN, y se incubó a

37°C durante 12 horas. Al término, se contó el número de placas de cada dilución, y se estimó el título por la siguiente fórmula:

$$\text{ufp/ml} = (\text{No. de placas}) / (\text{Vol})(\text{Dil})$$

4. Obtención de lisógenas.

Para obtener lisógenas de cada uno de los fagos obtenidos, se picó el halo de lisis de una placa turbia en AN, a objeto de obtener colonias aisladas, y se incubó a 37°C toda la noche.

El estado lisogénico de cada candidata se determinó por inmunidad a la superinfección por el mismo fago y por la liberación de progenie viral sobre un tapiz de *E. coli* C600.

La estabilidad de la lisógena se determinó por inmunidad y liberación de fagos de diez colonias aisladas obtenidas a partir de una colonia de la lisógena, repitiendo este procedimiento tres veces.

5. Determinación de la inmunidad de las lisógenas para fagos silvestres.

Para agrupar y diferenciar los fagos obtenidos se determinó la inmunidad de cada lisógena a cada fago, así como al fago λ^+ , a objeto de clasificarlos por grupos de inmunidad. Esto se realizó cultivando la bacteria lisógena en 5 ml de CN, durante 24 hrs a 37° C posteriormente se realizó un

tapiz de la bacteria lisógena en AN , se gotearon 10 μ l de cada fago a títulos 10^{-2} 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} .

Se incubó toda la noche a 37° C. Se determinó la formación de halo de lisis para cada fago. Este procedimiento se repitió 3 veces para cada lisógena obtenida (tabla 2).

6. Adhesión a células bucoepiteliales humanas (CBH).

Las CBH se obtuvieron por raspado vigoroso del carillo de donadores adultos sanos con hisopos. Las CBH se lavaron tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 para eliminar a las bacterias autóctonas y se colectaron por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. La suspensión celular se ajustó a 5×10^5 CBH/ml por cuenta en un hematocitómetro de Neubauer.

Las bacterias utilizadas para el ensayo de adhesión se crecieron en Agar de Soya y Trypticase por 18 h a 37°C. Después de colectarlas por raspado con una varilla de vidrio estéril, se lavaron por centrifugación tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 y se resuspendieron a una concentración de 2×10^8 /ml.

Para el ensayo de adhesión se mezcló 1 ml de CBH con 0.2 ml de bacterias y la mezcla se incubó 2 h a 37°C y 20 rpm. Después de este lapso,

la mezcla se lavó tres veces con Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. para eliminar las bacterias no adheridas. Después del primer lavado se agregaron dos gotas de eritrosina B al 0.4%. Se preparó un frotis de la suspensión final y se tiñó con azul de metileno al 0.4%, se enjuagó con agua y se examinó por microscopia de luz, anotando el número de bacterias adheridas a cada una de 40 CBH.

En cada experimento se incluyeron los siguientes controles:

- a) Sin adición de bacterias, para determinar el número de bacilos autóctonos adheridos.
- b) Adición de la cepa de *E. coli* C600
- c) Adición de la cepa de *E. coli* C600(λ)

7. Extracción de DNA de bacteriófagos

Para extraer el DNA de los bacteriófagos se obtuvieron placas aisladas y una de ellas se resuspendió en 1 ml de SM y se incubó a 4°C toda la noche. Al día siguiente se infectaron 100 μ l de un cultivo saturado de *E. coli* C600 con 150 μ l de la suspensión del fago. La mezcla de infección se incubó a temperatura ambiente durante 20 min para favorecer la adsorción de los fagos a las bacterias. Enseguida se añadieron 50 ml de CN y se incubó con agitación a 37°C hasta lisis (12-16 h). Posteriormente se agregaron 10 gotas

de cloroformo y se incubó 15 min a 37°C para completar la lisis. El lisado se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 min en una centrífuga Sorvall (rotor SS34). El sobrenadante se pasó a dos tubos Corex de 30 ml y cada uno de éstos se le agregaron 4 ml de solución de precipitación, se mezcló por inversión y se incubó a 4°C toda la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min en una centrífuga Sorvall (rotor SS34). Se decantó totalmente el sobrenadante para eliminar el polietilenglicol. La pastilla de cada tubo se resuspendió con micropipeta en 250 µl de buffer TE, y el contenido de ambos se reunió en un tubo eppendorf estéril nuevo. Se agregaron 250 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex a nivel medio por 2 min. Se centrifugó en eppendorf durante 2 min a temperatura ambiente. La fase acuosa (superior) se pasó a otro tubo eppendorf estéril nuevo. Se agitó en vortex 2 min a nivel medio. Se centrifugó en eppendorf durante 2 min a temperatura ambiente y la fase acuosa se pasó a otro tubo eppendorf. Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.8 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto helado; se mezcló por inversión varias veces y se dejó precipitar el DNA a -20°C durante 1 h. Se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. La pastilla se lavó dos veces por centrifugación con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se resuspendió en 100 µl de agua desionizada estéril.

8. Detección de la secuencia homóloga al gen *lom*.

Amplificación del gen *lom* de λ por PCR.

Para amplificar el gen *lom* de λ y los posibles *lom* like en algún (os) colifagos, se utilizó la polimerasa High Fidelity PCR System (Lakeside). La mezcla de reacción contenía:

Adición	Volumen	[final]
Buffer 10X	5 μ l	1X
DNTP's 10 mM	1 μ l	0.2 mM
Oligo lom1	1 μ l	25 pMoles
H2O dest. Inyect. P/ λ	40.7 μ l	
P/otros fagos	36.7 μ l	
Aceite mineral	50 μ l	
Oligo lom2	1 μ l	25 pMoles
DNA λ	1 μ l	500 ng
DNA otros fagos	5 μ l	500 ng
High Fidelity PCR System	0.3 μ l	1.6 U

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 min a 94°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 45 s a 72°C; y 1 ciclo de 5 min a 72°C.

El PCR se hizo por la técnica hotstart para evitar reacciones inespecíficas, en un termocycler Stratagene (Robocycler Gradient 40), y se incluyó un control de mezcla de PCR sin DNA templado. Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% que se corrieron a 86 Volts durante 90 min utilizando Buffer TBE 1X.

Para detectar posibles secuencias homólogas a *lom* en los fagos silvestres, se aisló el DNA de cada fago para utilizarlo como molde con oligonucleótidos complementarios al gen *lom* de λ (ver figura 4). Estos primers, u oligonucleótidos, fueron diseñados y analizados por Octavio García (Lab. de Genética, UMF) utilizando el programa de cómputo OLIGO a efecto de que no se apareasen inespecíficamente, no hibridaran entre sí y no formaran estructuras internas de asa y tallo. El primer superior incluye desde el segundo codón transcrito del gen y el inferior hasta el último codón transcrito, esto fue con el propósito de obtener la secuencia completa, incluida la señal de exportación de la proteína. Las condiciones de amplificación para λ , particularmente la concentración de Mg^{++} , fueron determinadas experimentalmente por O. García, usando el DNA de λ como templado (Figura 4).

Secuencia del gen *lom* del fago λ

```
1 ctgagtgtgt tacagaggt cgtccgggaa cgggcgtttt attataaac agtgagaggt
61 gaacgATGCGTAATGTGTGT ATGCCGTIG Ctgtcttgc cgcacttgc gtagacagca
121 ctccggcccc tgcggaaggt ggacatgga cgtttacggt gggctatftt caagtgaac
181 cgggtacatt gccgtcgttg tgggccccggg ataccggtgt gagtcactcg aaagggatta
241 acgtgaagta ccgttatgag ctgacggaca gtgtgggggt gatggcttcc ctggggttcg
301 ccgcgtcga aagagcagc acagtatga ccggggagga tacgtttcac tatgagagcc
361 tgcgtggagc ttatgtgagc gtgatggccg gaccggtttt acaaatcagt aagcaggta
421 gtgcgtacgc catggccgga gtggctcaca gtcggtggtc cggcagtaca atggattacc
481 gtaagacgga aatcactccc gggatataga aagagacgac cactgccagg gacgaaatg
541 caatcggca tacctcagtg gcgtggagtg caggtataca gattaatccg gcagcgtccg
601 tcgtgttga tattcttat gaaggctccg gcagtggcga ctggcgtact gacggattca
661 TCGTTGGGGT CGGTTATAAA TTCtattag ccaggaataca c
```

ATG= Codón de inicio

Figura 4. Secuencia nucleotídica del gen *lom* del fago λ . Los oligonucleótidos que se utilizarán para amplificar este gen por PCR se muestran subrayados y con mayúsculas pequeñas. (Secuencia tomada de Internet (Entrez Reports), NID g288849 (accession number X55793). (Ref. Barondess, J. & J. Beckwith, 1990).

RESULTADOS.

Dado que el gen *lom* del fago λ incrementa la adhesión de *E. coli* a CBH (García, O. *et al.*, 1996, Vaca, S. *et al.*, 1997), nos pareció razonable suponer que, debido a la ventaja selectiva que este gen podría conferirle a su lisógena y al propio fago, *lom* se encontraría ampliamente distribuido en las poblaciones de colifagos silvestres. Para explorar esta posibilidad, aislamos 10 colifagos capaces de lisogenizar establemente a la cepa C600 de *E. coli* a partir de 300 cepas de *E. coli* silvestres de la colección de la Dra. Valeria Souza (Centro de Ecología de la UNAM).

Para clasificar a los fagos en grupos de inmunidad se infectaron por separado todas las lisógenas con cada uno de ellos. Los fagos pertenecientes a un mismo grupo de inmunidad, se identificaron por el criterio de infección cruzada negativa doble; es decir, cuando el fago X fue incapaz de multiplicarse en C600(Y) y el fago Y tampoco creció en X. Por este criterio se pudo clasificar a los 10 colifagos aislados, en 6 grupos de inmunidad (Tabla 2).

Para determinar si estos fagos poseían al gen *lom*, obtuvimos su DNA y lo utilizamos como templado para amplificar al gen *lom* utilizando como iniciadores oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' del gen

lom del fago λ , tomando como referencia la secuencia nucleotídica reportada por Barondess (Barondess, J.J. 1990). Los 10 fagos silvestres poseen una secuencia posiblemente con *lom*, como puede inferirse por el hecho de que todos ellos permitieron la amplificación de un fragmento de DNA de masa molecular muy similar al del gen *lom* de λ (Figura 6; sólo se muestra la amplificación de *lom* en 6 de los colifagos silvestres, los resultados de los otros 4 fueron similares), el control de PCR sin DNA templado, no mostró producto de amplificación alguna, lo cual indica la ausencia de algún posible DNA contaminante, que pudiese funcionar como templado.

De los 10 colifagos silvestres, sólo 3 (503, 436 y 203) incrementaron la adhesión de la cepa de C600 de *E. coli* a CBH, a niveles comparables al incremento conferido por λ (Tabla 3).

Tabla 2. Grupos de inmunidad de los fagos silvestres.

C600 LISOGENICA PARA EL FAGO							
FAGO	λ	503	484	426	430	436	435
		203	411	428	429		
λ	-	+	+	+	-	+	-
203	+	-	+	-	+	+	+
411	+	+	-	-	-	+	+
428	+	+	-	-	-	+	+
429	-	+	-	-	-	+	+
436	+	+	+	+	+	-	+
435	-	+	+	-	+	+	-

+ = Multiplicación del fago

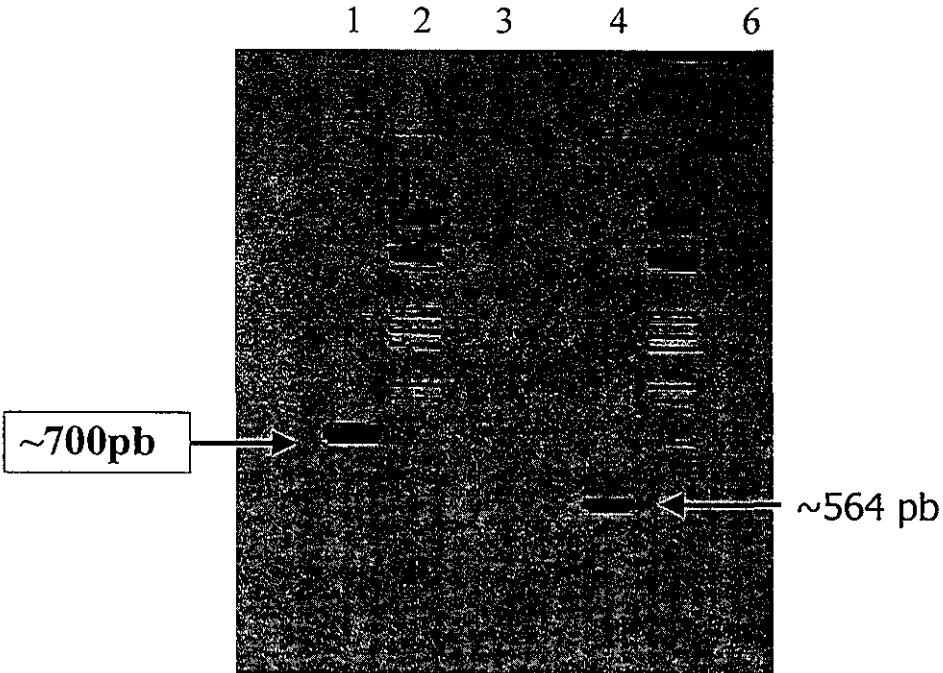
- = Ausencia de multiplicación del fago.

Tabla 3. Efecto de colifagos silvestres sobre la adhesión de *Escherichia coli* a CBH.

CEPA	BACTERIAS/CBH
Ninguna añadida	1.3 ± 1.0
C600	20.2 ± 1.8
C600 (λ)	30.1 ± 1.8
C600 (503)	29.4 ± 1.6
C600 (436)	28.9 ± 1.9
C600 (203)	26.1 ± 1.7
C600 (435)	20.4 ± 1.7
C600 (430)	20.9 ± 2.0
C600 (411)	20.3 ± 1.7
C600 (429)	20.7 ± 2.1
C600 (426)	20.6 ± 1.9
C600 (484)	19.3 ± 1.6
C600 (428)	20.7 ± 1.8

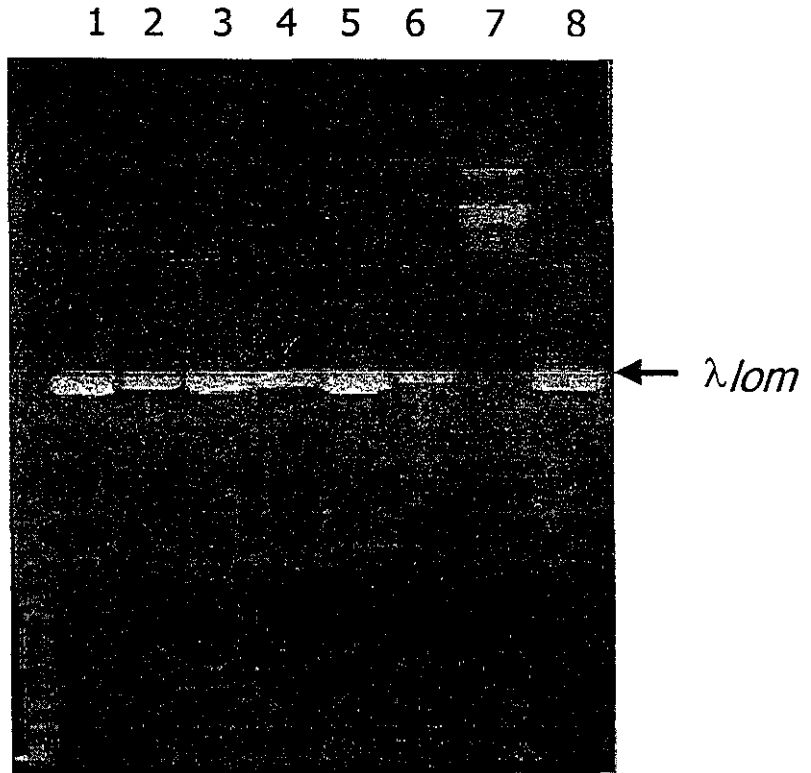
Figura 5.

AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *lom* y *bor* de λ



Carriles: 1 λ *lom*; 2 y 5 λ HindIII-EcoR1; 4 λ *bor*; 3 y 6 sin DNA molde.
Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 min a 94°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 45 s a 72°C; y 1 ciclo de 5 min a 72°C. El PCR se hizo por hotstart para evitar reacciones inespecíficas. Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% que se corrieron a 86 Volts durante 90 min utilizando Buffer TBE 1X.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen lom like en colifagos silvestres.



Carriles: 1-6 fagos nativos; 7 λ HindIII; 8 λ

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

En este trabajo aislamos 10 colifagos a partir de 300 cepas silvestres de *E. coli* de origen humano. Es probable que la frecuencia de cepas lisogénicas entre las que estudiamos sea mayor, y que el relativamente bajo número de profagos que aislamos refleje el hecho de que no todos los posibles bacteriófagos presentes fueron capaces de adsorberse a, o de multiplicarse en la cepa C600 de *E. coli* K12, dado que esta cepa puede carecer del receptor utilizado por algun bacteriófago y además es proficiente en restricción y quizá por ello, el DNA de algunos fagos silvestres fue degradado. No obstante, los 10 fagos aislados poseen secuencias homólogas al gen *lom* del fago λ , como puede inferirse del hecho que el DNA de todos ellos sirvió como templado para la amplificación, por PCR, de un fragmento de DNA de tamaño similar al del gen *lom* de λ , utilizando como primers oligonucleótidos complementarios a los extremos 3' y 5' del gen *lom* de λ , lo cual habla de la importancia en cuanto a conservación a nivel de DNA para este gen, ya que estos amplificados no solo muestran homología a nivel de secuencia con *lom* de λ , al menos en las regiones de hibridación de los oligonucleótidos, sino que también existe similitud en el tamaño de estas

secuencias con respecto a sí mismas (todas aquellas obtenidas a partir de DNA de cada colifago silvestre) y a λ *lom*.

La presencia de las secuencias *lom*-like en estos colifagos, correlacionó con el fenotipo de adhesión incrementada de la lisógena correspondiente a células bucoepiteliales humanas en 3 de 10 fagos silvestres (tabla 3). Cabe mencionar, que los fagos 503 y 203, pertenecen al mismo grupo de inmunidad, mientras que el fago 436, no comparte inmunidad con ninguno de los otros 10 fagos, incluyendo a λ (tabla 2). La ausencia del fenotipo de adhesión incrementada en las lisógenas para los 7 fagos restantes podría explicarse por cualquiera de las siguientes posibilidades:

1) El gen *lom* no está siendo expresado debido a que carece de promotor, o éste (el promotor) se encuentra mutado.

2) El alelo de *lom* presente está mutado y, por ello, no confiere el fenotipo.

La mutación podría abatir la función de la proteína Lom al impedir que ésta se exporte y/o tenga la conformación adecuada en la membrana externa de *E. coli*, pudiendo afectar diversos factores necesarios para que

se de el fenotipo de adhesión aumentada, tal como el anclaje y/o el reconocimiento de algún sitio específico en las CBH.

3) El fenotipo de adhesión aumentada conferido por el gen *lom*, tal vez no dependa únicamente de éste (García, O. *et al.*, 1996., Vaca, S. *et al.*, 1997), y sí sea consecuencia de un efecto aditivo de los productos de *lom* y otro(s) gen(es) de λ (vinculados tal vez a genes cromosómicos de *E.coli*), los cuales estarían involucrados probablemente en la regulación, exportación o anclaje a la membrana de la proteína Lom. De ser cierta esta posibilidad y de encontrarse presente(s) este o estos genes virales, podrían estar mutados, y por lo tanto, el fenotipo de adhesión aumentada no sería observado.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Bibliografia.

1. Barksdale, L. & S.B. Arden, 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Ann. Rev. Microbiol.* 28:265-299.
2. Barondess, J.J. & J. Beckwith. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . *Nature* 346: 871-874.
3. Barondess, J.J. & J. Beckwith. 1995. *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* 177:1247-1253.
4. Binns, M.M., D.L. Davies & K.G. Hardy, 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279:778-781.
5. Court, D. & A.B. Oppenheim, 1983. Phage lambda's accessory genes. En *Lambda II*. Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl & R.A. Weisberg (eds). p. 251, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
6. Echols, H., 1972. Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Ann. Rev. Gen.* 6:157-190.
7. Echols, H., 1979. Bacteriophage & Bacteria: Friend and foe. *The Bacteria*, Vol. VII, Chapter 8, p. 487-516.

8. García, O., S. Pérez, D. Arenas & S. Vaca. 1996. Genes de virulencia en profagos. Memorias del Congreso Mexicano de Bioquímica, Manzanillo, Col.
9. Hackett, J., P. Wyk, P. Reeves & V. Mathan. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11 kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J. Infect. Dis.* 155:540-549.
10. Harp, L.H. (1988) En *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (Roth, J.A., DE.) pp.3-27. ASM Press, Washington, D.C.
11. Heffernan, E.J., J. Harwood, J. Fierer & D. Guiney, 1992. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* 174:84-91.
12. Hernández, V.J., T.D. Edlin, R.F. Young & G.M. Ihler, 1985. The DNA between *Rz* and *cosR* in bacteriophage lambda is nonessential. *Gene* 33:363-365.
13. Hershey, A.D., E. Burgi & L. Ingraham, 1963. Cohesion of DNA molecules isolated from phage lambda. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 49:748-755.

14. Miller, S.I., A.M. Kukral & J. Mekalanos, 1989. A two component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5054-5058.
15. Miller, V.L. & S. Falkow, 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infect. Immun. 56:1242-1248.
16. Miller, V.L., J.B. Bliska & S. Falkow, 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica ail* gene and characterization of the Ail protein product. J. Bacteriol. 172:1062-1069.
17. Muschel, L.H., & K. Schmoker, 1966. Activity of mitomycin C, other antibiotics, and serum against lysogenic bacteria. J. Bacteriol. 92:967-971.
18. Pulkkinen, W.S. & S.I. Miller, 1991. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. J. Bacteriol. 173:86-93.
19. Reeve, J.N. & J.E. Shaw, 1979. Lambda encodes an outer membrane protein: The *lom* gene. Molec. Gen. Genet. 172:243-248.
20. Stoorvogel, J., M. Van Bussel, J. Tommassen & J. Van de Klundert, 1991. Molecular characterization of an *Enterobacter cloacae* outer membrane protein (OmpX). J. Bacteriol. 173:156-160.

21. Szybalski, E. & W. Zzybalski, 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7: 217.
22. Vaca, S. , J. Arce, G. Oliver, D. Arenas & F. Argüello, 1989. FIZ15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 31:1-5.
23. Vaca, S. , E. Piedra, D. Arenas & G.L. Paniagua, 1993. λ prophage decreases *Escherichia coli* sensitivity to human serum bactericidal effect. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 35:71-75.
24. Vaca, S., O. García & G.L. Paniagua, 1997. The *lom* gene of bacteriophage λ is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Letters* 156:129-132.
25. Young, E.T. & R.L. Sinsheimer, 1964 Novel intra-cellular form of lambda DNA *J. Mol. Biol.* 10:562-564.