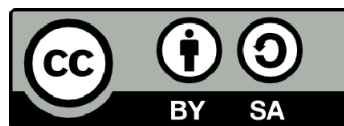




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Clonación y caracterización del operon de la ramnosa de *Escherichia coli*

Josefa Badia Palacín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA



"CLONACION Y CARACTERIZACION DEL OPERON DE LA
RAMNOSA DE ESCHERICHIA COLI"

Tesis presentada por JOSEFA BADIA PALACIN, pa-
ra optar al grado de Doctor en Farmacia.
El trabajo ha sido realizado en el Departamento
de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Barcelona, bajo la dirección de
los Drs. Juan Aguilar Piera y Alberto Boronát
Margosa.

Josefa Badia Palacin

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Juan Aguilar Piera", sobre una línea horizontal.

Dr. Juan Aguilar Piera

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser "Alberto Boronát Margosa", sobre una línea horizontal.

Alberto Boronat Margosa

Barcelona, abril de 1987

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700081720

Al finalizar el presente trabajo, desearía expresar el más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma la han hecho posible.

Al Dr. Juan Aguilar Piera, Director de este trabajo, por su atención, ayuda y estímulo constante a lo largo del desarrollo del mismo.

Al Dr. Alberto Boronat Margosa, Codirector de este trabajo, por sus acertados consejos y por su orientación en el desarrollo de múltiples aspectos del mismo.

Al Dr. Fausto Garcia Hegardt, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por haberme permitido realizar este trabajo en su Departamento.

A mis compañeros de laboratorio Laura Baldomà, Rosa Jimenez, Elena Hidalgo, Estrella Caballero y Juaquin Ros, por su colaboración totalmente desinteresada en la discusión de y realización de ciertos aspectos de este trabajo, así como por las horas agradables compartidas y en especial a Nuria Obradors quien además ha colaborado en la mecanografía del presente trabajo.

A Guillermina Asins, por su animo y espíritu de lucha en los momentos difíciles, a Carmen Caelles, por sus acertados consejos y a los restantes miembros del Departamento de Bioquímica, con los que he convivido estos años y que de una u otra forma me han ayudado en la tarea experimental.

A E.C.C.Lin del Departamento de Microbiología de Harvard Medical School por sus consejos y estimulantes sugerencias y a Yu Mei-Chen del mismo laboratorio, por los meses de trabajo compartidos en nuestro centro.

ABREVIACIONES MAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

| | |
|------------------|---|
| Amp | Ampicilina sódica |
| ATP | Adenosina-5+-trifosfato |
| dNTP | Deoxinucleótido-trifosfato |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| Ci | Curi |
| cpm | cuentas por minuto |
| DEAE | Dietilaminoetil |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Acido desoxiribonucleico |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Etilendiamino tetrácetico |
| Fuc ⁻ | Fenotipo de no utilización de Fucosa |
| x g | Gravedad |
| x-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- -galactopiranósido |
| Kb | Kilobases |
| Kd | Kilodaltons |
| IPTG | Isopropil- -D-tiogalactopiranósido |
| J | Julios |
| M, mM, uM | Molar, milimolar y micromolar |
| ml ,ul | mililitro, microlitro |
| NBT | Azul de nitrotetrazolio |
| pfu | Unidades formadoras de placas de lisis |
| PPO | Difeniloxazol |
| POPOP | 1,4bis (5-feniloxazol-2-il)-benceno |
| Rha ⁻ | Fenotipo de no utilización de la ramnosa |
| r.p.m | Revoluciones por minuto |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletildiamina |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| U | Unidades de actividad |
| UV | Ultravioleta |
| λ dil | 10mM Tris-ClH (pH7,5) y 10mM SO ₄ H ₂ |

INDICE

| | pagina |
|---|--------|
| 1. INTRODUCCION | |
| 1.1. Metabolismo de L-fucosa y L-ramnosa en <u>E.coli</u> | 1 |
| 1.2. Metabolismo del L-1,2 propanodiol en mutantes de <u>E.coli</u> | 6 |
| 1.3. Metabolismo de fucosa y ramnosa en enterobacteriaceae: <u>Klebsiella</u> S.P y <u>Salmonella</u> s.p | 9 |
| 1.4. Estudios de regulación y organización génica del operón <u>rha</u> | 12 |
| 1.5. Estudios de regulación y organización génica del operón <u>fuc</u> | 22 |
| 1.6. Relación entre los sistemas de la fucosa y ramnosa en <u>E.coli</u> | 30 |
| 1.7. Los sistemas <u>fuc</u> y <u>rha</u> : un modelo de duplicación génica en <u>E.coli</u> | 33 |
| 2. MATERIALES Y METODOS | |
| 2.1. Cepas bacterianas, plasmidos y fagos | 43 |
| 2.2. Técnicas microbiológicas | 48 |
| 2.2.1. Condiciones de crecimiento bacteriano.. | 48 |
| 2.2.2. Obtención de mutantes por inserción de Tn5 | 49 |
| 2.3. Preparación de extractos celulares..... | 51 |
| 2.4. Técnicas determinativas..... | 52 |
| 2.4.1. Determinación de proteína..... | 52 |
| 2.4.2. Determinación de actividades enzimáticas..... | 52 |
| 2.4.2.1. Determinación de la actividad L-ramnosa isomerasa..... | 52 |
| 2.4.2.2. Determinación de la actividad L-ramnosa permeasa..... | 53 |
| 2.5. Obtención y purificación de DNA genómico de <u>E.coli</u> | 55 |
| 2.5.1. Obtención de DNA genómico de <u>E.coli</u> a gran escala | 55 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2.Obtención de DNA genómico de <u>E.coli</u> a pequeña escala..... | 57 |
| 2.5.3.Purificación del DNA genómico en gradiente de ClCs..... | 58 |
| 2.6.Obtención y purificación del DNA del bac- teriófago lambda..... | 61 |
| 2.6.1.Obtención de fagos a pequeña escala... | 61 |
| 2.6.2.Obtención de fagos a gran escala..... | 62 |
| 2.6.3.Purificación de los fagos..... | 63 |
| 2.6.4.Obtención de DNA fágico..... | 65 |
| 2.7.Digestión de DNA con endonucleasas de restricción..... | 67 |
| 2.7.1.Construcción de mapas de restricción.. | 71 |
| 2.8.Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa..... | 74 |
| 2.8.1.Extracción con papel DEAE-celulosa.... | 74 |
| 2.8.2.Extracción en fase orgánica (CETAB)... | 76 |
| 2.9.Marcaje de DNA por "nick translocation"..... | 79 |
| 2.10.Transferencia de DNA genómico a filtros de nitrocelulosa..... | 83 |
| 2.11.Hibridación DNA-DNA sobre filtros de nitrocelulosa..... | 86 |
| 2.12.Clonación de DNA genómico en el bacterio- fago lambda L47..... | 88 |
| 2.12.1.Obtención de moléculas recombinan- tes de DNA fágico..... | 88 |
| 2.12.2.Obtención de extractos de empaque- tamiento..... | 89 |
| 2.12.2.1.Extracto obtenido a partir de la cepa BHB2690,por efec- to de ultrasonidos..... | 90 |
| 2.12.2.2.Extracto obtenido a partir de la cepa BHB2688,por congela- ción-descongelación..... | 91 |
| 2.12.3.Empaquetamiento in"vitro" del DNA fagico..... | 92 |

| | |
|---|-----|
| 2.13. Identificación y aislamiento de clones recombinantes..... | 94 |
| 2.14. Clonación de DNA genómico en plásmidos..... | 96 |
| 2.15. Transformación de <u>E. coli</u> con DNA plasmídico.. | 99 |
| 2.15.1. Preparación de células competentes.... | 99 |
| 2.15.1.1. Método de CaCl ₂ | 100 |
| Método de RbCl/CaCl ₂ | 101 |
| 2.15.2. Transformación..... | 102 |
| 2.16. Preparación de DNA plasmídico..... | 104 |
| 2.16.1. Obtención de plásmido a gran escala... 104 | |
| 2.16.2. Obtención de plásmido a pequeña escala. 107 | |
| 2.17. Técnicas electroforéticas..... | 109 |
| 2.17.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa..... | 109 |
| 2.17.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS..... | 111 |
| 2.18. Expresión de genes en maxicelulas..... | 115 |
| 2.19. Detección de proteínas radioactivas por fluorografía..... | 119 |
| 2.19.1. Método del salicilato sódico..... | 119 |
| 2.19.2. Método del DMSO/PPO..... | 120 |
| 2.20. Técnica de autorradiografía indirecta | 122 |
| 2.21. Productos y reactivos utilizados..... | 123 |

3. RESULTADOS

| | |
|---|-----|
| 3.1. Obtención y caracterización de fagos recombinantes conteniendo parte del locus <u>rha</u> | 128 |
| 3.1.1. Inducción de la fase lítica en la cepa lisogénica ET1248..... | 129 |
| 3.1.2. Selección de fagos recombinantes..... | 130 |
| 3.1.3. Caracterización de los fagos recombinantes $\lambda_{prha\ 1}$ y $\lambda_{prha\ 2}$ | 132 |
| 3.2. Aislamiento a partir del fago recombinante λ_{prha2} de un fragmento de DNA genómico correspondiente al locus <u>rha</u> de <u>E. coli</u> | 135 |
| 3.2.1. Construcción del plásmido pJB1 conteniendo un fragmento EcoRI-EcoRI del fago λ_{prha2} | 135 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2. Mapa de restricción del plásmido pJB1... | 136 |
| 3.2.3. Obtención de un fragmento específico del plásmido pJB1 para su utilización como sonda..... | 139 |
| 3.3. Mapa físico de una región conteniendo parte del operón <u>rha</u> | 143 |
| 3.3.1. Localización de dianas EcoRI y BamHI mediante análisis de los fragmentos genómicos con homología a secuencias del operón <u>rha</u> | 143 |
| 3.3.2. Verificación mediante análisis genómicos de que la región clonada corresponde al operón <u>rha</u> | 147 |
| 3.4. Preparación de una genoteca parcial BamHI de <u>E. coli</u> en el bacteriófago λ L47.1..... | 152 |
| 3.5. Aislamiento y caracterización de clones de la genoteca conteniendo secuencias del operón <u>rha</u> . | 154 |
| 3.6. Construcción del plásmido pJB2 por subclonaje del inserto BamHI del fago <u>prha</u> 3 en el plásmido pUC18..... | 156 |
| 3.7. Obtención y análisis de nuevos clones con secuencias flanqueantes a las previamente clonadas..... | 159 |
| 3.8. Construcción de una colección de plásmidos conteniendo secuencias que abarcan la totalidad de la región clonada..... | 164 |
| 3.9. Caracterización de los plásmidos recombinantes obtenidos por complementación de mutantes puntuales en el operón <u>rha</u> | 175 |
| 3.10. Expresión de plásmidos recombinantes en maxicelulas..... | 177 |
| 3.11. Determinación de la actividad ramnosa isomerasa en mutantes Rha ⁻ transformados con diferentes plásmidos..... | 184 |
| 3.12. Determinación de la actividad ramnosa permeasa en mutantes Rha ⁻ transformados con diferentes plásmidos..... | 188 |

| | |
|---|-----|
| 4. DISCUSION | |
| 4.1.Preparación de una sonda genómica para el clonaje y estudio del operón <u>rha</u> | 191 |
| 4.2.Construcción de genotecas de <u>E.coli</u> y aislamiento de clones correspondientes al operón <u>rha</u> . | 194 |
| 4.3.Actividades enzimaticas de mutantes Rha ⁻ transformados con diversos plásmidos conteniendo secuencias del locus Rha ⁻ | 198 |
| 4.4.Caracterización de los productos de expresión de los genes clonados..... | 200 |
| 4.5.Integración de las informaciones obtenidas en un modelo actualizado del operón de la ramnosa. | 203 |
| 5. CONCLUSIONES | 206 |
| 6.BIBLIOGRAFIA | 208 |

INDICE DE TABLAS

| | Página | | Página |
|---|--------|---|--------|
| 1 | 20 | 6 | 175 |
| 2 | 26 | 7 | 183 |
| 3 | 46 | 8 | 189 |
| 4 | 69 | 9 | 189 |
| 5 | 138 | | |

INDICE DE FIGURAS

| | | | |
|----|-----|----|-----|
| 1 | 4 | 16 | 146 |
| 2 | 8 | 17 | 148 |
| 3 | 14 | 18 | 150 |
| 4 | 21 | 19 | 157 |
| 5 | 28 | 20 | 161 |
| 6 | 36 | 21 | 165 |
| 7 | 41 | 22 | 167 |
| 8 | 131 | 23 | 168 |
| 9 | 133 | 24 | 171 |
| 10 | 134 | 25 | 173 |
| 11 | 137 | 26 | 174 |
| 12 | 140 | 27 | 180 |
| 13 | 141 | 28 | 181 |
| 14 | 144 | 29 | 182 |
| 15 | 145 | | |

1. INTRODUCCION

1.1. METABOLISMO DE L-FUCOSA Y L-RAMNOSA EN E.COLI.

La L-fucosa y la L-ramnosa son dos azúcares naturales que E.coli es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía. La diferencia estructural entre la ramnosa (6-deoxi-manosa) y la fucosa (6-deoxi-galactosa) esta unicamente en la posición del radical hidroxilo del C₂ y C₄.

La L-fucosa se metaboliza a través de la acción secuencial de una serie de enzimas inducibles: la fucosa permeasa (69), la fucosa isomerasa (65) , la fuculosa quinasa (74) y la fuculosa-1-fosfato aldolasa (63). Por acción de este último enzima se forma fosfato de dihidroxiacetona y L-lactaldehido. Aeróbicamente, el L-lactaldehido es oxidado a lactato por una lactaldehido deshidrogenasa constitutiva (142). El L-lactato es transformado en piruvato por una lactato deshidrogenasa inducible (probablemente del tipo flavoproteína) (44,85).

Anaerobicamente, todo el lactaldehido es reducido a propanodiol por acción de un enzima inducible, la propanodiol óxido-reductasa y excretado al medio (44) (figura 1).

La ramnosa se metaboliza por una vía análoga a la descrita para la glucosa por acción secuencial de una serie de enzimas inducibles: la ramnosa permeasa, ramnosa isomerasa (162, 149) y la ramnulosa quinasa (163, 40, 150) y la ramnulosa-1-fosfato aldolasa (132,41,42,135) (figura 1).

Las vias convergen en un punto de modo que lo descrito para fucosa es valido para glucosa. Como consecuencia de la acción de este último enzima, se forma dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehido. Aerobicamente el L-lactaldehido puede ser oxidado a piruvato por acción secuencial de la lactaldehido deshidrogenasa (142,14) y la lactato deshidrogenasa (44). Anaerobicamente, el L-lactaldehido es transformado a propanodiol óxido reductasa y excretado al medio (24). En este proceso se regenera NAD⁺, hecho indispensable para el ulterior metabolismo de la ramnosa.

Se ha de destacar que si bien existe una gran analogía entre las reacciones implicadas en el catabolismo de la fucosa y de la ramnosa, los enzimas que participan son altamente específicos para cada vía así como su inducción.

La localización cromosómica de los genes en ambos sistemas es totalmente diferente. Así, mientras el sistema de la fucosa (fuc) se encuentra localizado en el minuto 60,2, el sistema responsable del metabolismo de la ramnosa (rha) está en el minuto 87,2 dentro del cromosoma circular de E.coli (12). Por tanto, a pesar de la gran similitud estructural entre la fucosa y la ramnosa, así como entre sus vías de degradación, los sistemas fuc y rha se comportan de forma diferente por lo que respecta a los cuatro primeros enzimas de la vía metabólica. Estos dos sistemas parecen tener una organización genética diferente, aspecto que será tratado con más detalle en otro apartado de introducción.

Con relación a la propanodiol óxido-reductasa, enzima anaeróbico que comparten ambas vías metabólicas, cabe decir que presenta el mismo peso molecular, movilidad electroforética y propiedades cinéticas tanto si la inducción se produce por crecimiento anaeróbico en fucosa o ramnosa. Este enzima presenta amplia especificidad de sustrato, así, además de actuar sobre el propanodiol y lactaldehído, el enzima es activo sobre otros alcoholes y aldehídos estructuralmente relacionados, presentando actividad deshidrogenasa sobre etanol, propanol, etilenglicol y glicerol; actividad reductasa sobre acetaldehído, propionaldehído, glicolaldehído y L-gliceraldehído. En todos los casos a excepción de propanol, el enzima presenta menor afinidad para estos compuestos que para el sustrato natural: L-propanodiol y L-lactaldehído.

Otra característica destacable es que si bien presenta amplia especificidad de sustrato demuestra tener una gran estereoespecificidad para el cofactor NAD (o NADH) no pudiendo usarse el NADP, por ejemplo, como cofactor.(23).

Por otra parte estudios de KM, Vmax y energía de activación permitieron evidenciar que la reacción catalizada por la propanodiol óxido-reductasa esta altamente favorecida en el sentido de transformación del lactaldehido a propanodiol.(24).

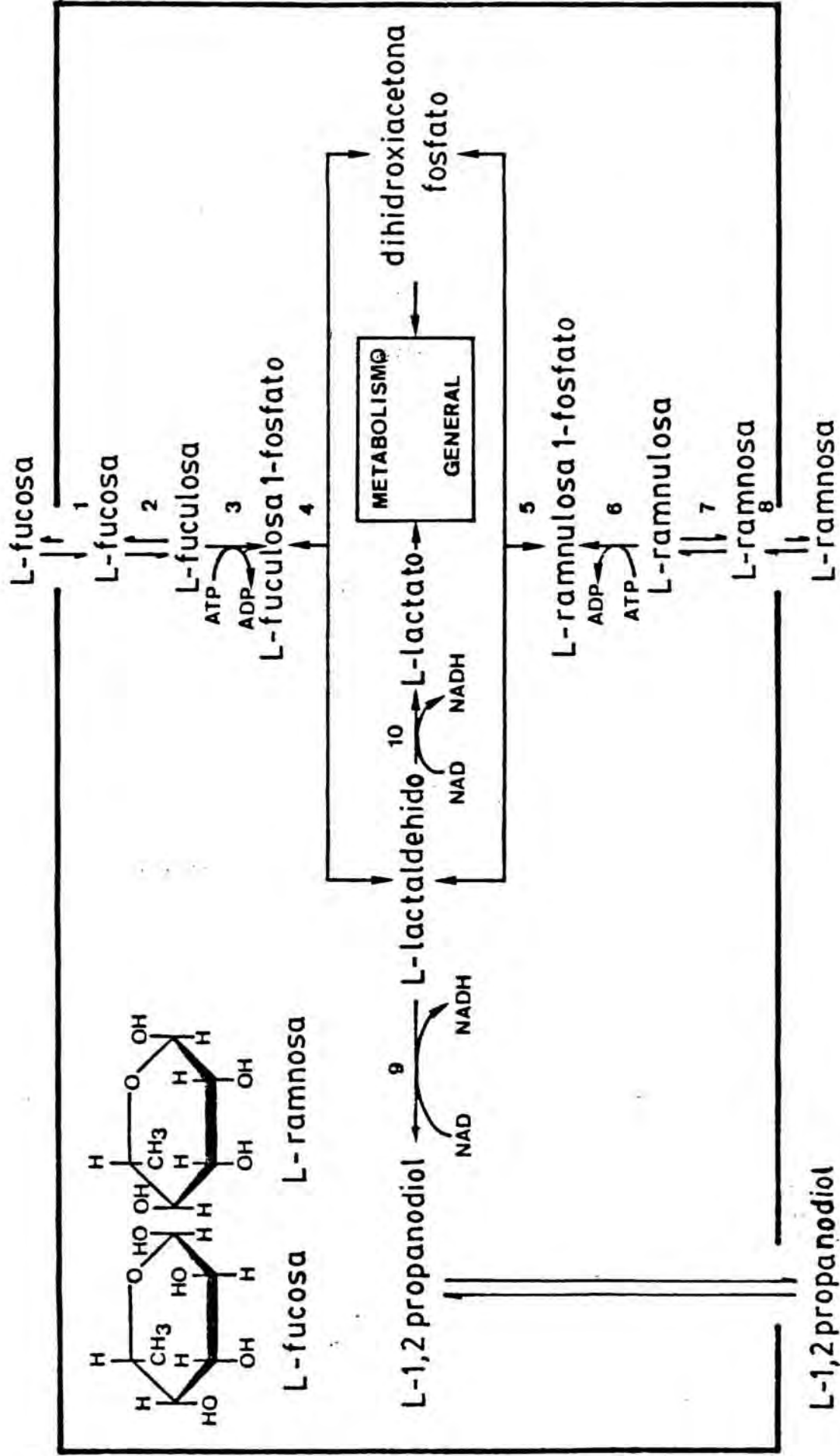
Hay que hacer mención de que fucosa o ramnosa ejercen un control diferente sobre la expresión del gen genes que codifican este enzima. Así, el enzima propanodiol óxido-reductasa inducida por el crecimiento en ramnosa se encuentra bajo un control de tipo transcripcional, sintetizándose, únicamente, en condiciones anaeróbicas. Por el contrario, el crecimiento de E.coli en fucosa, en condiciones aeróbicas, comporta la síntesis del enzima propanodiol oxido-reductasa en estado inactivo, que es activado si se transfiere a condiciones anaeróbicas, indicando que en este caso, el enzima está bajo control de tipo post-transcripcional (38) si bien no se conoce todavía cual es el mecanismo por el que dicho enzima se activa.

El catabolismo aeróbico de la L-fucosa y la L-ramnosa comparten , también, el enzima lactaldehido deshidrogenasa, el cual es inducido por el crecimiento aeróbico en ambos azúcares. En cuanto a la localización del gen estructural de este enzima, así como a su regulación, cabe hacer mención que son poco conocidos. Está descrito que el gen estructural de la lactaldehido deshidrogenasa se encontraría bajo control de un inductor (muy probablemente el propio lactaldehido) y una proteína reguladora, diferentes de los que controlan el sistema de la fucosa (98). Lin y Wu se basan en el diferente comportamiento en cuanto a la inducción de la lactaldehido deshidrogenasa respecto a los demás enzimas implicados en el metabolismo de la fucosa en diversas cepas mutantes de E.coli analizadas.

En el estudio realizado por Power, referente a la organización genética y regulación de los genes que componen el operón rha, no se describe la participación del gen de

FIGURA 1. METABOLISMO AEROBICO Y ANAEROBICO DE LA
L-FUCOSA Y LA L-RAMNOSA EN E. COLI

- 1) Fucosa permeasa
- 2) Fucosa isomerasa
- 3) Fuculosa quinasa
- 4) Fuculosa-1-fosfato aldolasa
- 5) Ramnulosa-1-fosfato aldolasa
- 6) Ramnulosa quinasa
- 7) Ramnosa quinasa
- 8) Ramnosa permeasa
- 9) Propanodiol oxido-reductasa
- 10) Lactaldehido deshidrogenasa



la lactaldehido deshidrogenasa dentro de este sistema.

En cuanto a la localización del gen de la lactaldehido deshidrogenasa dentro del cromosoma de E.coli, Chakrabarti y col. lo describen cerca del sistema fuc (35). Esta localización no concuerda con resultados preliminares que indicarían un gen estructural fuera del sistema fuc, si bien se ha localizado cerca de este operón una mutación termo-sensible que afectaría muy probablemente el gen regulador (14).

1.2 METABOLISMO DEL L-1,2-PROPANODIOL EN MUTANTES DE E.COLI

E.coli tipo salvaje es incapaz de crecer en L-1,2 propanodiol cuando este es utilizado como fuente de carbono y energía.

Sridhara y col. (143) aislaron un mutante (cepa 3) a partir de E.coli K12 tipo salvaje, seleccionado por su capacidad de utilizar L-1,2 propanodiol, después de mutagénesis química y posterior reciclaje (más de 100 generaciones) en medios conteniendo D,L-1,2 propanodiol. De esta mezcla racémica sólo se utilizaba el isómero L, que a concentraciones 20 mM permitía su crecimiento con un tiempo de duplicación de 140 minutos (69) presentando el cultivo, un rendimiento similar al obtenido en glicerol (143).

Una de las características más importantes de este mutante, era la síntesis constitutiva de un enzima con actividad propanodiol deshidrogenasa. Esta actividad que no estaba presente en la cepa tipo salvaje, parecía esencial para este mutante (143). Cocks y col, identificaron este enzima como la propanodiol oxido-reductasa inducible, en la cepa tipo salvaje, por crecimiento en condiciones anaeróbicas en fucosa y ramnosa.

Actualmente se ha determinado por técnicas inmunológicas, la presencia del enzima propanodiol oxido-reductasa en células crecidas aeróbicamente en las fuentes de carbono inductoras, si bien este enzima es en estas condiciones inactivo. Ello explica que diversos autores no detectarían actividad alguna en tales condiciones.

Con el fin de confirmar la actividad de la propanodiol oxido-reductasa y el enzima con actividad deshidrogenasa, del mutante, Cocks y col. se basaron en una serie de hechos que interrelacionaban la capacidad de producir y de utilizar propanodiol, tales como que el lactaldehído era un intermediario del metabolismo de fucosa (63) y de la ramnosa (132) y el hecho de que algunas bacterias excretasen propanodiol durante la fermentación de la ramnosa (86).

La propanodiol oxido-reductasa es sintetizada constitu-

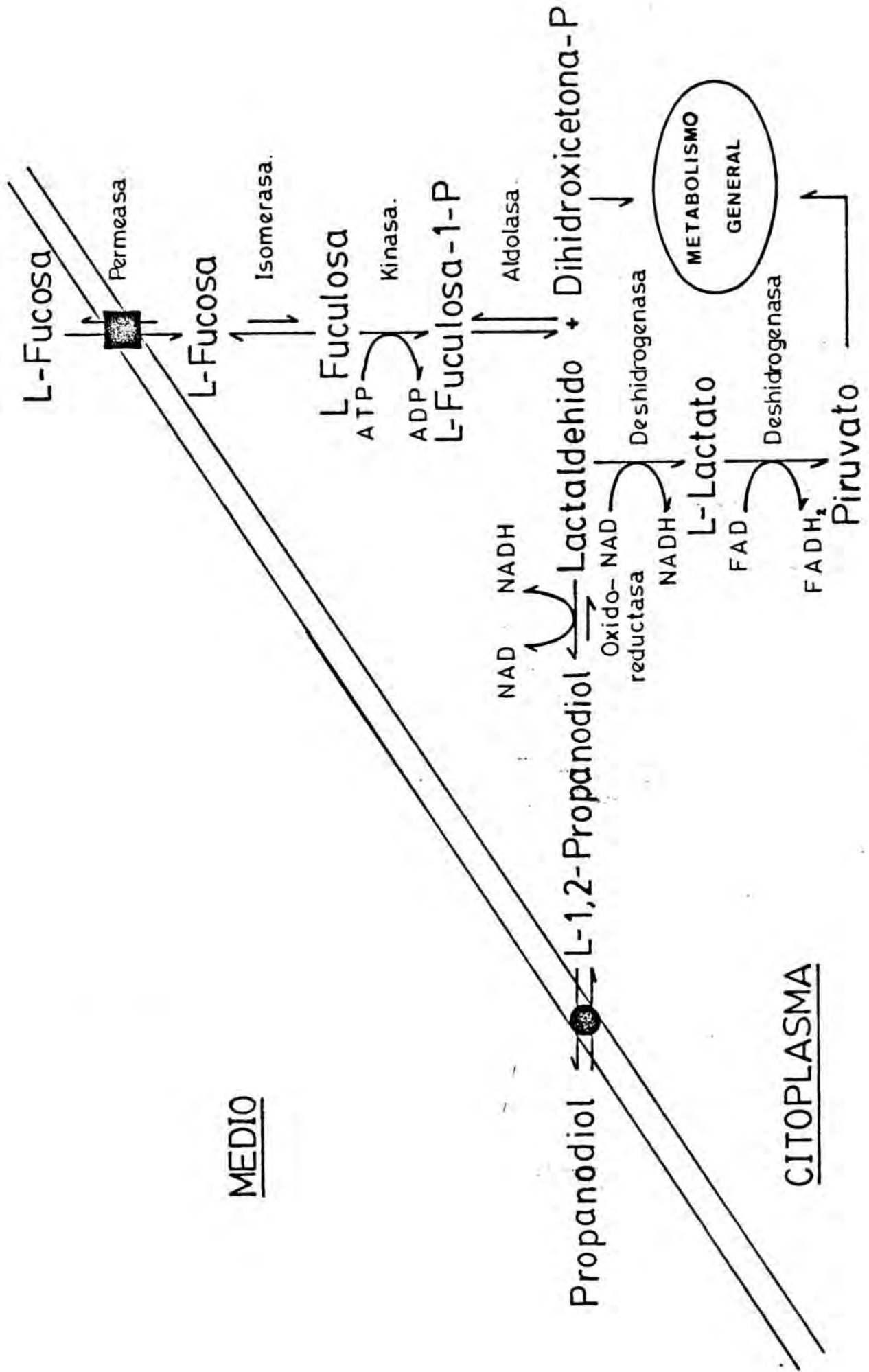
tivamente en la cepa 3 y cataliza en el metabolismo del L-1,2 propanodiol la reacción de oxidación de dicho glicol a L-lactaldehído, actuando sobre el grupo alcohol primario (a diferencia de la glicerol deshidrogenasa de E.coli que actúa sobre el grupo hidroxilo del C-2).

El L-lactaldehído formado es oxidado a lactato por acción del enzima lactaldehído deshidrogenasa, inducida por el crecimiento en L-1,2 propanodiol (142). El lactato induce una lactato deshidrogenasa que lo transforma en piruvato, compuesto que puede ser introducido en el metabolismo general (44).

Como se puede observar, existe una estrecha relación entre la vía de degradación del L-1,2-propanodiol en la cepa 3 y la vía de utilización de la L-fucosa en la cepa de tipo salvaje. La vía metabólica que permite la utilización de un nuevo compuesto (propanodiol), en el mutante, es un caso de inversión en la dirección normal de una ruta metabólica ya establecida, la del metabolismo anaeróbico de la L-fucosa y la L-ramnosa, debido a condiciones externas diferentes (figura 2).

Sridara y Wu demostraron la implicación directa de la lactaldehído deshidrogenasa en el metabolismo del L-1,2 propanodiol (142). Estos autores describen que este enzima es sintetizado semiconstitutivamente en la cepa tipo salvaje (cepa 1) y en la cepa 3. Comprobaron que mutantes seleccionados por su incapacidad de crecer en placas que contenían discos impregnados de lactaldehído, por tanto carecían del enzima lactaldehído deshidrogenasa, eran incapaces de crecer en L-1,2 propanodiol, a pesar de poseer niveles constitutivos del enzima propanodiol oxido-reductasa (cepa 40). Así mismo, medidas de la radioactividad incorporada por diversas cepas de E.coli a partir de D,L-1,2 propanodiol marcado con ^{14}C , pusieron de manifiesto que sólo incorporaban radioactividad, las cepas propanodiol positivas. La cepa 40 no utilizaba el sustrato radioactivo a pesar de tener una propanodiol óxido-reductasa constitutiva.

FIGURA 2. METABOLISMO DEL L-1,2-PROPANODIOL Y SU
RELACION CON EL METABOLISMO DE LA L-FU-
COSA EN E.COLI.



1.3 METABOLISMO DE FUCOSA Y RAMNOSA EN ENTEROBACTERIACEAE: KLEBSIELLA S P Y SALMONELLA S P

Salmonella typhimurium y Klebsiella pneumoniae crecen aeróbicamente en L-fucosa (131,144) y en L-ramnosa (130, 114) como única fuente de carbono y energía.

En el caso de Klebsiella aerogenes, está descrita una vía de utilización de fucosa que consta de una fucosa isomerasa, una fuculosa quinasa y una fuculosa-1-fosfato aldolasa (144). Una vía paralela, pero específica para la ramnosa, parece ser la responsable en estas células, del metabolismo de este último azúcar.

En el caso de Salmonella typhimurium no hay descrita en la literatura ninguna vía de utilización de fucosa, pero sí de ramnosa (5) donde este azúcar se metaboliza por acción secuencial de un conjunto de enzimas inducibles, que comprenden la ramnosa isomerasa, la ramnulosa quinasa y la ramnulosa -1-fosfato aldolasa.

Así la fucosa y la ramnosa son metabolizadas aeróbicamente en Klebsiella s,p y Salmonella s,p por vías semejantes y paralelas a las descritas en E.coli (apartado 1.1).

En E.coli está descrito que por acción de una aldolasa, la molécula fosforilada de 6 átomos de carbono, proveniente tanto del metabolismo de L-fucosa como de L-ramnosa, se escinde en fosfato de dihidroxiacetona y L-lactaldehído. Aeróbicamente estos dos productos son introducidos al metabolismo general: el fosfato de dihidroxiacetona via glicolisis y el L-lactaldehído es oxidado a lactato por acción de la lactaldehído deshidrogenasa.

A pesar de todo, no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica, sobre las vías metabólicas de la L-fucosa y la L-ramnosa en Klebsiella s,p y Salmonella s,p, en las que se describa la transformación de los productos formados por acción de las aldolasas respectivas. Así pues, no se pone de manifiesto la presencia de una actividad lactaldehído deshidrogenasa en estas bacterias, en relación con el metabolismo de ambos azúcares.

Anaeróbicamente, Salmonella typhimurium y Klebsiella pneumoniae fermentan estos azúcares de forma semejante a E.coli. Así el L-lactaldehído formado, es reducido, en condiciones anaeróbicas, a 1,2-propanodiol por una propanodiol óxido-reductasa inducible y excretado al medio (13) si bien a diferencia de E.coli, este diol es posteriormente reutilizado por estas enterobacterias (111).

Este enzima, indispensable para el metabolismo anaeróbico de la fucosa y la ramnosa, ha sido ampliamente estudiado en E.coli (24,25,26,126) y comparado desde los puntos de vista de estructura y regulación con los enzimas y actividades propanodiol óxido-reductasa de Klebsiella pneumoniae y Salmonella typhimurium (127).

El análisis estructural indica que los tres enzimas presentan el mismo peso molecular, mientras que el punto isoeléctrico es ligeramente diferente para el enzima de Salmonella typhimurium. Los enzimas de Klebsiella pneumoniae y E.coli presentan idéntico perfil de bandas en los mapas peptídicos monodimensionales, obtenidos por digestión con diversas proteasas. Por el contrario, el enzima de Salmonella typhimurium se muestra diferente, a excepción de la digestión con subtilisina, lo que indica, ya que el enzima corta entre dos aminoácidos hidrofóbicos, y que las zonas hidrofóbicas de la propanodiol óxido-reductasa de las tres especies han sido conservadas a lo largo de la evolución y que muy probablemente interaccionan con otras proteínas hidrofóbicas.

El enzima de Klebsiella pneumoniae presenta identidad inmunológica con el de E.coli, mientras que el enzima de Salmonella typhimurium, solo presenta identidad parcial.

Desde el punto de vista de regulación, las tres especies inducen una propanodiol óxido reductasa activa cuando crecen anaeróbicamente en fucosa y ramnosa. La presencia de este enzima, detectada inmunologicamente en el crecimiento aeróbico en ambos azúcares es diferente según la especie estudiada. Así, Salmonella typhimurium durante

el crecimiento aeróbico en fucosa y ramnosa, sintetiza una propanodiol óxido-reductasa inactiva que es rápidamente activada si se somete a condiciones anaeróbicas, E.coli es capaz de inducir también, en condiciones aeróbicas, una propanodiol óxido-reductasa inactiva, pero únicamente cuando crece en fucosa. Este enzima está sometido a un control de tipo post-transcripcional cuando el cultivo es transferido a condiciones anaeróbicas (38).

Por el contrario, Klebsiella pneumoniae no es capaz de inducir ningún enzima con actividad propanodiol óxido-reductasa, ni tan siquiera la forma inactiva, cuando crece en condiciones aeróbicas en presencia de estos dos azúcares. El control es por tanto de tipo transcripcional en condiciones anaeróbicas.

La ausencia en extractos celulares de Salmonella typhimurium crecida en condiciones aeróbicas en fucosa y ramnosa, del enzima lactaldehido deshidrogenasa, fué confirmada también mediante el empleo de anticuerpos anti lactaldehido deshidrogenasa de E.coli, así, por técnicas de inmunodifusión no se detectó ningún halo de precipitación (14).

La incapacidad de síntesis de un enzima con actividad lactaldehido deshidrogenasa presenta implicaciones directas con el metabolismo aeróbico de la ramnosa y la fucosa en estos microorganismos. El L-lactaldehido formado por acción de la aldolasa, no puede ser oxidado hasta lactato, a diferencia de lo que sucede en E.coli y Klebsiella pneumoniae.

1.4 ESTUDIOS DE REGULACION Y ORGANIZACION GENICA DEL OPERON rha

El operón rha se encuentra situado en el minuto 87,2 del cromosoma circular de E.coli y a 2 minutos del gen metB1 (12).

Power en 1966 (117) abordó el estudio de la regulación y organización génica de dicho operón, en E.coli, mediante la utilización de mutantes Rha^- que fueron caracterizados atendiendo a su capacidad de crecimiento en medios con hidrolizado de caseína en presencia y ausencia de ramnosa por una parte y por otra, su capacidad de excretar ramnulosa en medios que habían sido suplementados con ramnosa. La ramnulosa es un metabolito intermediario en el catabolismo de la ramnosa.

En función de los resultados obtenidos, los mutantes Rha^- fueron clasificados en cuatro grupos que se detallan a continuación.

rhaA: No excretan ramnulosa al medio y su crecimiento se ve débilmente inhibido cuando crecen en medios suplementados con ramnosa.

rhaB: Excretan gran cantidad de ramnulosa al medio y su crecimiento es débilmente inhibido en medios que contienen ramnosa.

rhaC: No excretan ramnulosa, ni ven afectado su crecimiento por la presencia de ramnosa en el medio de cultivo.

rhaD: Excretan gran cantidad de ramnulosa y su crecimiento se ve fundamentalmente inhibido cuando el medio de cultivo está suplementado con ramnosa.

El estudio de la organización génica del locus rha en E.coli, se inició mediante técnicas de transducción especializada con el fago P1. Como cepas donadoras, se utilizaron diversas cepas de E.coli con fenotipo Rha^-Met^+ y que previamente habían sido caracterizadas como rhaA⁻, rhaB⁻, rhaC⁻ o rhaD⁻. Como cepas receptoras, se utilizaron diversos mutantes Rha^-Met^+ que habían sido también caracteriza-

dos como rhaA, rhaB, rhaC o rhaD.

Así se realizaron múltiples transducciones y los transductantes fueron seleccionados por su fenotipo Rha^+ en placas que contenían ramnosa y metionina. Seguidamente se procedió a estudiar el número de recombinantes Met^+Rha^+ por crecimiento en placas que contenían ramnosa como única fuente de carbono y energía.

Los resultados obtenidos indicaron que el fenotipo Rha^+ y Met^+ cotransducían a una frecuencia del 20%, lo que indicaba que los genes codificados por el locus rha y el gen metB1 se encuentran localizados en posiciones muy próximas dentro del cromosoma circular de E.coli. Este autor observó que dichos genes rha estaban situados en posiciones adyacentes y definían cuatro unidades bien diferenciadas desde el punto de vista genético. Se estableció además el orden relativo de los genes rhaA, rhaB, rhaC y rhaD con respecto al gen metB1 y que se muestra en la figura 3.

Con el fin de aportar nuevos datos en la regulación del locus rha, Power (117) llevó a cabo experimentos de complementación. Para ello utilizó mutantes Rha^- obtenidos por dos métodos: Unos a partir de la cepa P72 ($metB1F^+$), por mutagénesis química y otros obtenidos por conjugación

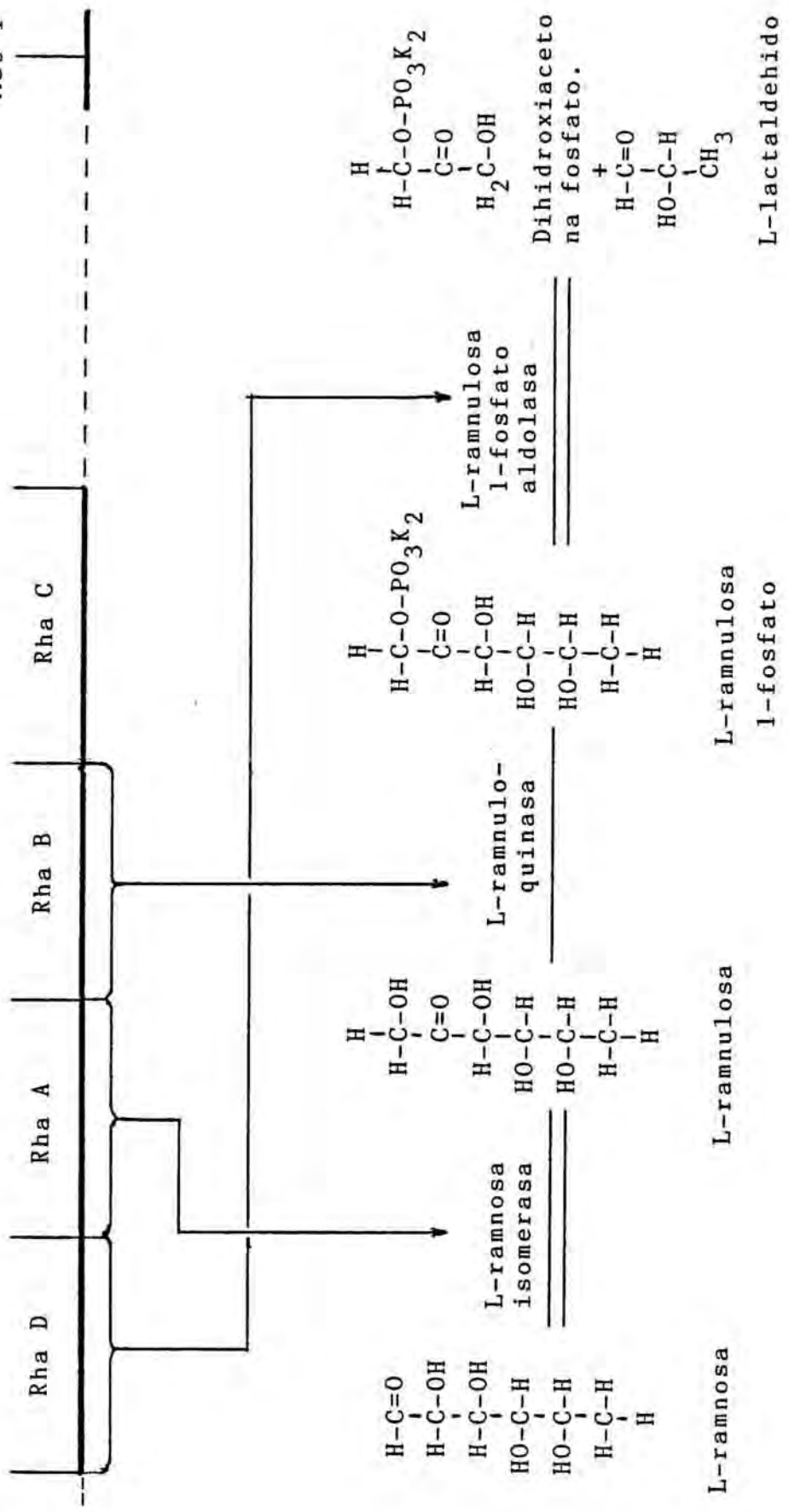
En el proceso de conjugación se utilizó como cepa donadora la cepa AB1206 (his4, thi1, pro2, $F'14$, $Strp^r$, Δ la región F14 en el endogenote) y como cepa receptora una cepa derivada de la cepa AB1450 (ilv16, metB1, arg1, his1, thi2, xyl4, mal1, F^-Strp^r), seleccionada por su fenotipo Met^+Rha^- . Como resultado de la conjugación se obtuvieron numerosos recombinantes (cepas diploides parciales), seleccionándose aquellos que presentaban el fenotipo Met^-Rha^- .

La cepa AB1206 se caracteriza por poseer en un episoma, un fragmento del genoma de E.coli que comprende los genes del locus de rha y los genes ilv, arg y met, que por otra parte estaban deleccionados en el cromosoma.

Todas las cepas Rha^- fueron caracterizadas y agrupadas como rhaA, rhaB, rhaC o rhaD, antes de ser utilizadas en los experimentos de complementación.

FIGURA 3. ORGANIZACION GENETICA DEL OPERON rha en E.COLI. Tomado de J.Power (117).

Met 1



Los resultados obtenidos en dichos experimentos permitieron definir tres cistrones correspondientes a los grupos rhaA, rhaB y rhaC. Los mutantes rhaC podían definir dos cistrones más, uno formado por el mutante denominado C70 y otro formado por el resto de mutantes rhaC analizados.

La característica principal es que el mutante C70 es capaz de complementar mutaciones que afectan al gen rhaC, a diferencia de los demás mutantes rhaC analizados que sólo son capaces de complementar mutaciones en el gen rhaA, rhaB y rhaD. Sin embargo Power atribuyó el comportamiento del mutante C70 como un efecto de complementaciones intracistrónicas, al no poder aislar ningún otro mutante con las mismas características.

Así mismo y por lo que respecta a los mutantes rhaB, se observa la presencia de un mutante denominado rhaB73, cuya mutación está localizada en el episoma, que es incapaz de complementar mutaciones en el gen rhaA y rhaD. Sin embargo esto se atribuyó a un efecto polar de la mutación ya que esta cepa presenta niveles muy bajos de actividad L-ramnosa isomerasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa con respecto a los que posee E.coli tipo salvaje.

Extractos celulares obtenidos a partir de mutantes puntuales Rha^- , crecidos en presencia de ramnosa, se utilizaron para el estudio de las actividades enzimáticas de las proteínas codificadas por los genes del locus rha. Así se pudo establecer, qué gen se hallaba afectado en cada grupo de mutantes analizados.

Se observó que los mutantes clasificados como rhaA, no expresaban el enzima L-ramnosa isomerasa ya que carecía de dicha actividad. Los mutantes rhaB, tenían una mutación en el gen que expresa el enzima L-ramnulosa quinasa. Los rhaD carecían de actividad L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa.

Los resultados obtenidos indicaron la presencia de un mutante denominado A50 que ~~pasa~~ a ser clasificado como rhaA, poseía un nivel de actividad isomerasa, quinasa y aldolasa suficiente para su crecimiento en ramnosa.

Este hecho puede explicarse por la presencia de una isomerasa sensible a algún inhibidor intracelular que se diluya o se inactive durante el proceso de extracción. Un enzima de análogas características se ha descrito en Neurospora Crassa, concretamente la tryptofano sintetasa (148)

Los mutantes rhaC carecían de las tres actividades ensayadas, lo que permitió sugerir que dichas mutaciones afectaban a un gen que expresa una proteína necesaria para la expresión de los otros tres genes.

No se han podido aislar mutantes deficientes en el enzima L-ramnosa permeasa y L-lactaldehído deshidrogenasa, muy probablemente debido al método de selección utilizado.

Power describe que con toda probabilidad la actividad de los genes rhaA, rhaB y rhaD pertenecientes al locus rha esta regulada, por un sistema de control positivo, en el que participa una proteína activadora codificada por el gen rhaC. Por esto una mutación en el gen rhaC afectaría la expresión coordinada de los genes estructurales rhaA, rhaB y rhaD.

Estudios realizados por Englesberg en 1957 (57) sobre la regulación del operón rha en Pasteurella pestis, pusieron de manifiesto que una única mutación era suficiente para que dicha bacteria expresara constitutivamente los dos primeros enzimas de la vía. Así mismo Englesberg y Baron en 1959 (58) en trabajos realizados con Salmonella typhimurium LT2 pusieron de manifiesto que una única mutación era suficiente para evitar la síntesis de L-ramnosa isomerasa y L-ramnosa quinasa.

Estos resultados demuestran una vez más que el locus rha esta bajo control del gen rhaC y que una mutación en el gen rhaC afecta la expresión de los demás enzimas de la vía.

Posteriormente Alzarban y col. en el año 1984 (5) abordaron el estudio de la regulación genética del operón rha en Salmonella typhimurium. Tal y como se detalla en el apartado 1.3 Salmonella typhimurium es capaz de metabolizar la ramnosa como única fuente de carbono y energía. La

via utilizada es similar a la descrita para otras bacterias, como es el caso de E.coli (117), Yersinia pestis (57), Salmonella typhosa (58) y Klebsiella pneumoniae.

Con este fin Alzarban, después de obtener mutantes Rha⁻ por mutación espontánea, mutagénesis química e inserción de Tn10, procedió a estudiar con todo detalle el crecimiento de cada mutante en un medio de cultivo en presencia y ausencia de ramnosa. Los resultados obtenidos, le permitieron clasificar los mutantes en tres grupos que se caracterizaban por:

Grupo I: Eran débilmente inhibidos por la presencia de L-ramnosa y eran además, capaces de acumular L-¹⁴C-ramnosa. De entre ellos cabía distinguir tres subgrupos: uno formado por aquellos mutantes rha⁻ que carecían de actividad L-ramnosa quinasa y que por tanto la mutación afectaba al gen rhaB. Otras cepas se caracterizaban por una reducción simultánea de los niveles de L-ramnulosa quinasa y L-ramnosa isomerasa y que no eran más que mutantes polares que tenían también afectado el gen rhaB. Y finalmente el último subgrupo lo formaban mutantes que carecían de actividad L-ramnosa isomerasa y por tanto tenían afectado el gen rhaA.

Grupo II: Eran mutantes incapaces de crecer en ramnosa como única fuente de carbono y energía, sin embargo su crecimiento no se veía alterado por la presencia de ramnosa en el medio de cultivo. Todos ellos carecían de actividad L-ramnosa isomerasa, L-ramnulosa quinasa y L-ramnosa permeasa. Una mutación en el gen regulador que expresase una proteína activadora de la transcripción de los otros genes que intervienen en esta vía, era con toda probabilidad la responsable de que dichos mutantes no viesen afectado su crecimiento por la presencia de ramnosa en el medio de cultivo (137, 161).

Grupo III: Ven fuertemente inhibido su crecimiento por la

por la presencia en el medio de cultivo de ramnosa. Carecen de actividad L-ramnosa-1-fosfato aldolasa, lo que favorece la acumulación en el medio de cultivo de L-ramnulosa y de su derivado fosforilado, L-ramnulosa -1-fosfato. La acumulación de intermediarios fosforilados en el metabolismo de carbohidratos, Produce una fuerte inhibición en el crecimiento debido a su toxicidad (46).

Así mismo, Alzarban obtuvo otros mutantes incapaces de crecer en ramnosa cuando ésta era añadida al medio de cultivo a una concentración final 10 mM, sin embargo cuando la concentración añadida era del orden de 50 mM, sí que eran capaces de crecer. Estos mutantes tenían alterado el gen L-ramnosa permeasa (rhaT). Así, cuando la concentración en el medio de cultivo era alta, la ramnosa entraba al interior de la célula por difusión pasiva y entonces podía ser metabolizada fácilmente. Estos autores indican que todas las mutaciones rhaT afectan a un gen situado en las proximidades de un resto de genes que constituyen el operón rha. Esto fué corroborado por la caracterización de un mutante rhaT obtenido por inserción del transposón Tn10. Después de la escisión del transposón este mutante era incapaz de crecer en medios mínimos suplementados con ramnosa, aunque la concentración adicionada hubiera sido de 50 mM, esto indicaba que al escindirse el transposón había afectado no solamente al gen rhaT sino también a genes adyacentes que intervenían en el metabolismo de la ramnosa.

Así mismo y con objeto de proceder al estudio de la organización genética del operón rha en Salmonella typhimurium LT2, Alzarban y col. procedieron a la selección, a partir de mutantes obtenidos por inserción de Tn10 (Tc^R), de derivados Tc^S según el método descrito por Bochner y col. (21). Estas cepas $Rha^- Tc^S$ no son más que mutantes que han visto delecionado un fragmento de DNA cromosómico perteneciente al locus rha.

Se analizaron las actividades enzimáticas de los mutantes $Rha^- Tc^S$, los resultados obtenidos permitieron conocer la organización génica del operón rha en Salmonella typhimurium (figura 4).

De los resultados obtenidos en experimentos de complementación llevados a cabo por transducción especializada con el bacteriofago P22 en mutantes rha^- , se pudieron identificar cuatro unidades cistronicas denominadas rhaA, rhaB, rhaC y rhaD.

Así mismo, cuando se procedió al análisis de mutantes rhaC, se pudo observar la existencia de dos subgrupos en función de su comportamiento en experimentos de complementación (Tabla 1).

Estos resultados permitieron concluir que el locus rhaC está formado por dos unidades funcionales desde el punto de vista genético.

Hasta ahora solo se conocía que el locus rhaC codificaba para una proteína activadora del sistema de ramnosa (117). Actualmente se sabe que el locus rhaC, está formado por dos genes denominados rhaR y rhaS (E.C.C. Lin, comunicación personal). Para la activación del operón rhaBAD, solo es necesario la proteína codificada por el gen rhaR, no siendo la función del gen rhaS conocida todavía.

El conocimiento actual del locus rhaC sugiere la presencia de dos genes con funciones independientes en lo que respecta al metabolismo de la ramnosa.

Así mismo el orden relativo de los genes estructurales del locus rha parece ser idéntico en E.coli que en Salmonella typhimurium, y todos ellos parecen estar bajo control de un gen regulador encargado de la síntesis de una activadora en presencia de inductor que según Power es la propia ramnosa.

TABLA 1

COMPLEMENTACION ENTRE MUTANTES $RhaC^-$, POR TRANSDUCCION ESPECIALIZADA. Tomada de Alzarban y col. (5).

| Cepa donadora | Cepa receptora | | | | | | | | | |
|---------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|---|
| | AZ005 | AZ093 | AZ102 | AZ103 | AZ002 | AZ012 | AZ094 | AZ108 | | |
| AZ005 | - | - | - | - | +/- | + | + | + | | + |
| AZ093 | - | - | - | - | + | + | + | + | | + |
| AZ102 | - | - | - | - | + | + | + | + | | + |
| AZ103 | - | - | - | - | + | + | + | + | | + |
| AZ002 | +/- | + | + | + | - | - | - | - | | - |
| AZ012 | +/- | + | + | + | - | - | - | - | | - |
| AZ094 | +/- | + | + | + | - | - | - | - | | - |
| AZ108 | +/- | + | + | + | - | - | - | - | | - |

Los resultados fueron interpretados después de 3 días de incubación a 37°C. + Presencia de colonias. - Ausencia de colonias. +/- Presencia de colonias de muy pequeño tamaño. Estos mutantes $rhaC$ fueron complementados por todos los mutantes $rhaA$, $rhaB$ y $rhaD$ analiza dos, resultados no mostrados en la presente tabla.

FIGURA 4. ORGANIZACION GENETICA DEL OPERON DE LA
RAMNOSA EN SALMONELLA TYPHIMURIUM. Toma-
do de Alzarban y col. (5)

GEN

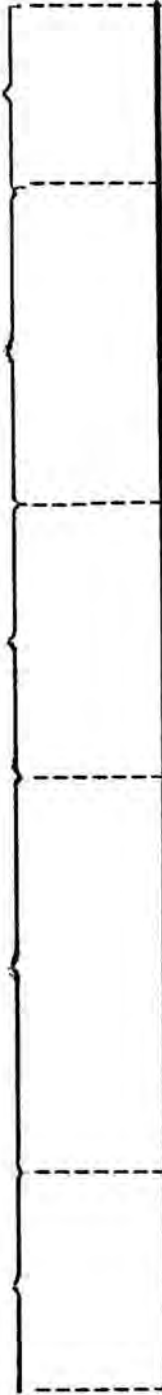
rhaT

rhaC

rhaB

rhaA

rhaD



1.5 ESTUDIOS DE REGULACION Y ORGANIZACION GENICA DEL OPERON fuc

El locus fuc, se encuentra situado en el minuto 60,2 (139- 140) dentro del cromosoma circular de E.coli.

El conocimiento de su organización génica se ha visto obstaculizada por la dificultad en poder distinguir si la falta de actividad de los enzimas que intervienen en el metabolismo de dicho azúcar, era debido a mutaciones localizadas en el gen regulador (70, 93,140) o bien a mutaciones que impidiesen la formación a partir de la fucosa, del verdadero inductor. Así Bartkus y Mortlock han apuntado la posibilidad de que la fuculosa-1-fosfato sea el verdadero inductor de los enzimas que intervienen en esta ruta metabólica, en E.coli (15). Trabajos realizados con otras bacterias y en concreto con Klebsiella pneumoniae, han puesto de manifiesto que el inductor era también la fuculosa-1-fosfato y no la fucosa o fuculosa.

Con el fin de estudiar el locus fuc y poder aportar nuevos datos sobre su complejidad genética, se utilizó en primer lugar un mutante (cepa 3) obtenido a partir de la cepa E.coli K-12 por su capacidad de utilizar 1,2 propanodiol, después de mutagénesis con etilmetanosulfonato y posterior reciclaje (más de 100 generaciones) en medios con D,L-1,2-propanodiol. Este mutante sintetizaba de forma constitutiva el enzima propanodiol óxido-reductasa (143), siendo éste enzima imprescindible para su crecimiento en L-1,2-propanodiol como única fuente de carbono y energía.

Esta mutación es pleiotrópica ya que afecta a otros enzimas de la vía, así este mutante expresa constitutivamente la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa y es incapaz de inducir la fucosa isomerasa y la fuculosa quinasa (69,70). La incapacidad de inducir los tres primeros enzimas de la vía hace que este mutante no pueda crecer, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas en L-fucosa. (44).

Experimentos de transducción especializada con el fago P1 permitieron determinar que la capacidad de metaboli-

zar el 1,2-propanodiol cotransducía con genes que intervienen en el metabolismo de la fucosa. En la actualidad se ha determinado que el gen prd se halla en realidad integrado en el sistema Fuc constituyendo uno de los genes de este sistema al que se ha denominado fucO atendiendo a su capacidad de codificación de la propanodiol óxido reductasa (61,151). Por otra parte cuando E.coli K-12 crece anaeróbicamente induce la síntesis de la propanodiol óxido-reductasa a la vez que excreta propanodiol al medio de cultivo, lo que de nuevo sugiere una interrelación entre fucosa y propanodiol.

Con el fin de comprobar si el carácter Prd⁺ estaba siempre unido al carácter Fuc⁻, se procedió a obtener, a partir de cepa 3, mutantes que revertisen a la utilización de fucosa (35). Se aislaron tres de estos mutantes independientes a los que denominaron cepa 55, 56 y 57 y del estudio de sus actividades enzimáticas se concluyó que en condiciones de inducción poseían niveles de actividad fucosa isomerasa, fuculosa quinasa, fuculosa-1-fosfato aldolasa y propanodiol óxido-reductasa similares a la cepa progenitora (cepa 1), si bien los niveles de actividad fucosa permeasa eran inferiores en todos los mutantes analizados. Estos mutantes de reversión parcial podían crecer aeróbicamente en fucosa y propanodiol, por lo que en este caso el carácter Fuc⁺ no estaba unido al carácter Prd⁻.

La obtención, a partir de cepa 3, de un mutante denominado cepa 430, seleccionado por su capacidad de crecimiento en 1,2-propanodiol a concentraciones inferiores a 0,5 mM, aportó nuevos datos en relación a la regulación de los genes que intervienen en el metabolismo de la fucosa.

Así la cepa 430 presenta una Km para el crecimiento en 1,2-propanodiol de 1mM (98) en contraposición con la Km de cepa 3 que resulta ser de 7 mM (24). La cepa 430 posee inactivado el gen de la aldolasa, mientras que el enzima propanodiol óxido-reductasa y lactaldehído des-

hidrogenasa se sintetizan constitutivamente, presentando niveles de actividad muy superiores a los de la cepa 3. Así mismo se observa una mayor velocidad en la entrada de propanodiol al interior de la célula, muy probablemente debido a la existencia en este mutante, de un transportador de membrana específico para este diol.

Los cambios enzimáticos que presenta la cepa 430 aceleran la entrada de propanodiol y su conversión a lactato, producto que es retenido más fácilmente en el interior de la célula ya que presenta cargas negativas. Los fosfolípidos que forman la membrana celular son poco permeables a compuestos cargados eléctricamente (52).

La ausencia de síntesis del enzima fuculosa-1-fosfato aldolasa, si bien es difícilmente explicable desde el punto de vista genético, muy probablemente va encaminada a prevenir la síntesis gratuita de proteínas.

La cepa 430 no es capaz de revertir su carácter Fuc^- por lo que con toda probabilidad son varias las mutaciones que han conducido a la obtención de dicho mutante a partir de cepa 3.

Así esta cepa (430) capaz de crecer con gran eficiencia en 1,2-propanodiol, se diferencia de cepa 3, no solo en la síntesis constitutiva del enzima propanodiol óxido-reductasa, sino también en su estructura. Estas diferencias estructurales se ponen de manifiesto por presentar pequeños cambios en cuanto a la especificidad de sustrato una estabilidad térmica inferior y un pH óptimo incrementado.

Lín y col. utilizaron por otra parte la mutagénesis con Tn5 de 10 clones independientes de la cepa 56 (revertante de cepa 3 seleccionado por su capacidad de crecer en fucosa). Ello les permitió seleccionar 7 mutantes $Fuc^- Km^r$. Estos mutantes se caracterizaban todos ellos por sintetizar constitutivamente el enzima propanodiol óxido-reductasa y por crecer en 1,2-propanodiol como única fuente de carbono y energía. Cinco de ellos carecían de actividad permeasa, isomerasa y quinasa; otro carecía

de actividad isomerasa y quinasa y el último carecía solo de actividad aldolasa (35).

La localización del locus fuc entre eno (minuto 59,6) y argA (minuto 60,5), ha permitido, mediante el empleo de fagos de transducción especializada (P1), y utilizando como punto de referencia dichos marcadores, determinar la localización precisa de fucosa. Con este fin, se procedió a la obtención de una cepa eno argA::Tn10 a la que se denominó cepa ECL289. Esta cepa se caracteriza por su crecimiento en placas conteniendo como fuente de carbono glicerol y succinato en presencia de arginina. Las cepas eno son capaces de crecer en presencia de ambos compuestos, pero son incapaces de crecer en glucosa.

Esta cepa (ECL289) fué posteriormente utilizada en experimentos de transducción como cepa receptora. Los mutantes de Tn5 fueron utilizados como cepas donadoras.

La selección en función de marcadores nutricionales se realizó por siembra en placas que contenían : glicerol y succinato para los Arg⁺; glucosa y arginina para los Eno⁺ y glucosa para los Arg⁺ y Eno⁺.

Posteriormente el caracter Km^r fué estudiado en todos los transductantes Arg⁺ por crecimiento en medios con succinato-glicerol-kanamicina y su caracter Fuc⁺ por crecimiento en medios con fucosa-succinato.

El caracter Km^r fué analizado en todos los transductantes Eno⁺ y los Arg⁺ Eno⁺ por crecimiento en LB-Km y su caracter Fuc⁺ por crecimiento en placas de McKonkey-fucosa.

Como resultado de este estudio se pudo verificar que todos los transductantes Km^r eran incapaces de crecer en fucosa, cuando ésta era utilizada como única fuente de carbono y energía y viceversa. Los resultados que se detallan en la tabla 2 demuestran que la inserción del Tn5 en un mutante derivado de la cepa 56 (denominada ECL429) impide la síntesis de la permeasa, isomerasa y quinasa y la inserción de Tn5 en el mutante denominado ECL475 impide únicamente la expresión de la aldolasa, ambas mutacio-

TABLA 2
 LOCALIZACION DE LA INSERCIÓN DEL TRANSPOSÓN Tn5 EN MUTANTES Fuc⁻ POR TRANSDUCCIÓN.
 Tomada de E.C.C.LIN.(35).

| Cepa donadora | Marcador(es) seleccionado(s) | Marcador no selectivo. | %Cotransducción con fuc::Tn5 |
|---------------|---|------------------------|------------------------------|
| ECL429 | <u>arg</u> ⁺ | <u>fucP</u> ::Tn5 | 57 |
| | <u>eno</u> ⁺ | <u>fucP</u> ::Tn5 | 40 |
| | <u>arg</u> ⁺ <u>eno</u> ⁺ | <u>fucP</u> ::Tn5 | 96 |
| ECL475 | <u>arg</u> ⁺ | <u>fucA</u> ::Tn5 | 50 |
| | <u>eno</u> ⁺ | <u>fucA</u> ::Tn5 | 34 |
| | <u>arg</u> ⁺ <u>eno</u> ⁺ | <u>fucA</u> ::Tn5 | 94 |

Los transductantes arg⁺ se seleccionaron por crecimiento en glicerol y succinato. Los eno⁺ por crecimiento en glucosa y arginina y los arg⁺eno⁺ por crecimiento en glucosa. En todos los casos se estudió posteriormente el porcentaje de Km^r obtenidos.

nes estaban situadas entre argA y eno. Los porcentajes de cotransducción permitieron además situar al locus fuc en una posición más próxima a argA que a eno.

De los resultados obtenidos en el estudio de todos los mutantes citados, se observa que el operón fuc es sumamente complejo. Así y de acuerdo con la variación en los niveles enzimáticos, observados en diversas cepas, permite sugerir que los genes que intervienen en el metabolismo de la fucosa constituyen un regulón formado por cinco operones que codifican: 1) la permeasa; 2) isomerasa y quinasa; 3) aldolasa; 4) propanodiol oxido-reductasa; 5) proteína reguladora.

El orden de los genes dentro del cromosoma circular de E.coli ha sido establecido gracias a la utilización de mutantes deleccionados en diferentes regiones del operón fuc, así en dirección contraria a las agujas del reloj encontraríamos: el gen regulador (fucC), el gen de la quinasa (fucK), el gen de la isomerasa (fucI), el gen de la permeasa (fucP), el gen de la aldolasa (fucA) y el gen de la propanodiol oxido-reductasa (fucO) (69,70,139) (figura 5)

Resultados obtenidos por St. Martin y Mortlock en el año 1976 en experimentos realizados sobre el metabolismo de fucosa en Klebsiella pneumoniae (antiguamente denominada Klebsiella aerógenes, (115)) son coincidentes a los obtenidos por Chakrabarti y col.(35), Así pusieron de manifiesto que la aldolasa se expresaba de forma independiente a la isomerasa y quinasa. Estos resultados ya apuntaban hacia la idea de que el locus fuc estaba formado por más de un operón.

Ya que el DNA de E.coli presenta un 25-50% de homología con el de Klebsiella pneumoniae (113) es fácil pensar que estas dos bacterias presenten gran analogía con respecto a la organización génica de sus operones.

La dificultad de obtener mutantes capaces de sintetizar constitutivamente todos los genes que intervienen en

FIGURA 5. ORGANIZACION GENETICA DEL LOCUS fuc EN
E.COLI. Tomado de E.C.C Lin y T.T. Wu.
(98)



MIN. 59,4

59,7

60

el metabolismo de fucosa (109), permiten apuntar que el gen regulador expresa una proteína capaz de activar por ella misma la transcripción de los genes estructurales del regulón fuc (control positivo). Si el sistema se encontrara bajo un control negativo, la frecuencia sería 1000 veces menor (10^{-6})

1.6. RELACION ENTRE LOS SISTEMAS DE LA FUCOSA Y RAMNOSA EN E.COLI.

E.coli es capaz de metabolizar L-fucosa por acción secuencial de un conjunto de enzimas inducibles: una permeasa, una isomerasa, una quinasa y una aldolasa codificados por el locus fuc (74,65,63)

La utilización de L-ramnosa implica la acción de un grupo similar pero específico de proteínas codificadas por el locus rha (132,162,163).

Actualmente se ha puesto de manifiesto que el crecimiento de E.coli K-12, HFr (ECL1) en condiciones anaeróbicas en ramnosa, no sólo induce los enzimas codificados por el locus rha, sino también la permeasa, la isomerasa, la quinasa, aldolasa y la propanodiol óxido-reductasa codificadas por el locus fuc. Por el contrario el crecimiento anaeróbico en fucosa no induce los genes del locus rha (37).

Se ha observado además que los enzimas codificados por el locus fuc alcanzan niveles de actividad idéntica por crecimiento de E.coli en fucosa o en ramnosa.

El estudio de otras dos cepas, denominadas ECL116 (es una cepa K-12 F⁻) y cepa Crookes (67) indica que la inducción gratuita de los enzimas de la vía de la fucosa por ramnosa no es una propiedad inherente a la cepa utilizada.

Con el fin de descartar la posibilidad de que la inducción producida por ramnosa fuese debida a una pequeña contaminación del azúcar utilizado, con fucosa se utilizó un mutante que tenía deletado el operón rha. Este mutante denominado ECL339 es incapaz de inducir, por crecimiento en presencia de ramnosa, los enzimas codificados por el locus fuc.

Otros experimentos fueron encaminados al estudio y conocimiento del verdadero inductor. Así, ya se conocía que la fuculosa-1-fosfato es el metabolito capaz de inducir los genes del locus fuc (98). y la ramnosa, por ella misma, es capaz de producir la inducción del locus rha (117), sin

embargo no se conocía si era también la propia ramnosa la responsable de la inducción cruzada del sistema de la fucosa. Para ello se obtuvieron mutantes Rha^- , cuya mutación afectaba a distintos genes y se procedió a estudiar el efecto producido sobre los enzimas de la fucosa, por el crecimiento de dichos mutantes en presencia de ramnosa.

Se observó que cuando el mutante utilizado estaba afectado en el gen rhaA, rhaB, rhaD o rhaR no se producía la inducción del locus fuc.

Así se vió que era necesario que la ramnosa fuese metabolizada hasta L-lactaldehído para que los genes del locus fuc fuesen inducidos. Un problema a tener presente en este contexto es que, puesto que el crecimiento de E.coli en L-lactaldehído, no es posible, debido al efecto tóxico de los aldehídos, se procedió a estudiar de forma cualitativa el poder inductor a pequeña concentración de este aldehído. Los estudios de inducción, en cualquier caso, se llevaron a cabo en una cepa denominada ECL326 que poseía fusionado los genes (fucO-LacZ). Esta cepa se hizo crecer en hidrolizado de caseína + IPTG + X-gal y en presencia de fucosa, ramnosa, L-lactaldehído o D-xilosa y se observó que el enzima β -galactosidasa se inducía por la presencia de fucosa, ramnosa o L-lactaldehído, pero no por D-xilosa.

Un experimento paralelo (control) se realizó mediante la utilización de una cepa, derivada de la anterior, denominada ECL511, que poseía una mutación en el gen rhaD y que por tanto era incapaz de inducir el enzima L-ramnulosa-1-fosfato-aldolasa, se observó que este mutante solo era capaz de inducir la β -galactosidasa por fucosa o L-lactaldehído pero no por ramnosa.

En la actualidad todavía no se conoce si realmente es el L-lactaldehído el que induce el regulón fuc o bien es debido a otro metabolito, concretamente la fuculosa-1-fosfato formado por acción de la aldolasa sobre el L-lactaldehído. Este enzima cataliza esta reacción de forma reversible. (98).

Un mutante puntual fucA denominado ECL476 y que posee una actividad aldolasa, con respecto a E.coli tipo salvaje, del 1% cuando crece en condiciones de inducción es capaz de inducir por crecimiento en ramnosa el locus fuc, lo que sugiere que el L-lactaldehído puede ser el verdadero efector del locus fuc.

Sin embargo no se conocía el mecanismo por el que el L-lactaldehído era capaz de producir tal inducción, ni tan siquiera si existía un gen que en presencia de dicho aldehído fuese capaz de expresar una proteína reguladora para el control del locus fuc por ramnosa, o si era el propio fucR el responsable de dicha inducción.

Para ello un mutante fucR (ECL477) se hizo crecer anaeróticamente en presencia de ramnosa y se observó, por estudio de las actividades enzimáticas, que no era capaz de inducir los genes del locus fuc. Sin embargo, cuando se realizaba el mismo experimento con la cepa ECL477 transformada con un plásmido recombinante que contenían el gen fucR se observaba una inducción del locus fuc.

Cabe pues decir que la inducción del locus fuc por ramnosa se produce por acción de un metabolito de la misma, con toda probabilidad el L-lactaldehído capaz de inducir el gen fucR que codifica para una proteína activadora de la transcripción de los genes estructurales de la fucosa. (E.C.C.Lin, comunicación personal).

1.7. LOS SISTEMAS fuc Y rha: UN MODELO DE DUPLICACION GENETICA EN E.COLI.

El metabolismo de L-fucosa y L-ramnosa se produce por acción secuencial de un conjunto de enzimas inducibles y específicos de cada azúcar: una permeasa, una isomerasa, una quinasa y una aldolasa que conducen en ambos casos a la formación de L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato. (149,150,40,42,142,143).

El L-lactaldehído formado a partir del catabolismo de la L-ramnosa o de la L-fucosa en E.coli es transformado en condiciones aeróbicas a lactato por acción de un enzima común, la lactaldehído deshidrogenasa. Igualmente en condiciones anaeróbicas este aldehído es reducido hasta L-1,2-propanodiol, por acción de un enzima codificado por un único gen y que se encuentra localizado en posición adyacente al locus fuc. Se ha podido observar que la regulación de la expresión de algunos enzimas como ocurre con el enzima propanodiol óxido-reductasa es diferente en ambos operones (26). Así se había descrito que este enzima se inducía por crecimiento de E.coli en fucosa o en ramnosa en condiciones anaeróbicas, no detectandose actividad alguna en condiciones aeróbicas y en presencia de inductor. La utilización de anticuerpos específicos antipropanodiol óxido-reductasa a permitido evidenciar la presencia de un enzima inactivo por el crecimiento en fucosa en condiciones aeróbicas, no detectandose la presencia del enzima inactivo por crecimiento aeróbico en ramnosa. Así mismo se ha visto que la adaptación a anaerobiosis es totalmente diferente si las células se han hecho crecer aeróbicamente en presencia de fucosa o ramnosa.

La diferente regulación de algunos de los genes que intervienen en el catabolismo de fucosa y ramnosa han podido tener un origen común por duplicación génica y posterior diferenciación.

El locus rha se encuentra localizado en el minuto 87,2

del cromosoma circular de E.coli y el locus fuc en el minuto 60,2. Esto supone una diferencia de 27 minutos y considerando que el cromosoma de E.coli esta dividido en 100 minutos, supone que se encuentran dispuestos formando un ángulo de 90°.

Hay que destacar que la posición relativa del locus fuc y rha en Salmonella typhimurium forma también un ángulo recto en la geometría circular del cromosoma de esta bacteria.

Esta disposición esta de acuerdo con el modelo propuesto por Zipkas y Riley (167). Según estos autores el cromosoma de E.coli habría sufrido dos duplicaciones completas, seguidas de mutaciones y posterior divergencia en las funciones de los genes duplicados (112). Esto llevaría a codificar enzimas con estructuras diferentes y que muy probablemente tendrían funciones diferentes. Este último aspecto es muy importante si se tiene en cuenta que se ha hecho mención de que la principal fuerza directriz de la evolución es la función de los enzimas (122).

Hoy esta ampliamente documentado que algunos de los genes que codifican enzimas relacionados funcionalmente se encuentran situados a 90° y 180° en el mapa de E.coli, lo que parece relevante en la elaboración de un modelo evolutivo.

Este modelo intenta explicar una de las posibles vías de evolución del genoma procariota. Así el proceso de evolución desde los primeros organismos (fermentadores anaeróbicos) hasta los aeróbicos y fototróficos requiere la aparición de nuevas vías metabólicas, que implican la evolución cualitativa y cuantitativa del genoma original (78,55). Puesto que es posible que fragmentos de gran tamaño se hayan duplicado (como veremos más adelante) es también posible que los genes se hayan duplicado una o varias veces. Esta duplicación se ha podido producir por la recombinación homóloga entre genomas isogénicos, o porque las cadenas formadas en los procesos de replicación

cromosómica no se hayan separado o bien por otras causas no conocidas todavía (171, 123).

Hopwood en 1962 (78) se dió cuenta de que algunos genes de Streptomyces coelicolor relacionados metabólicamente, se encontraban situados en puntos diametralmente opuestos en el mapa circular.

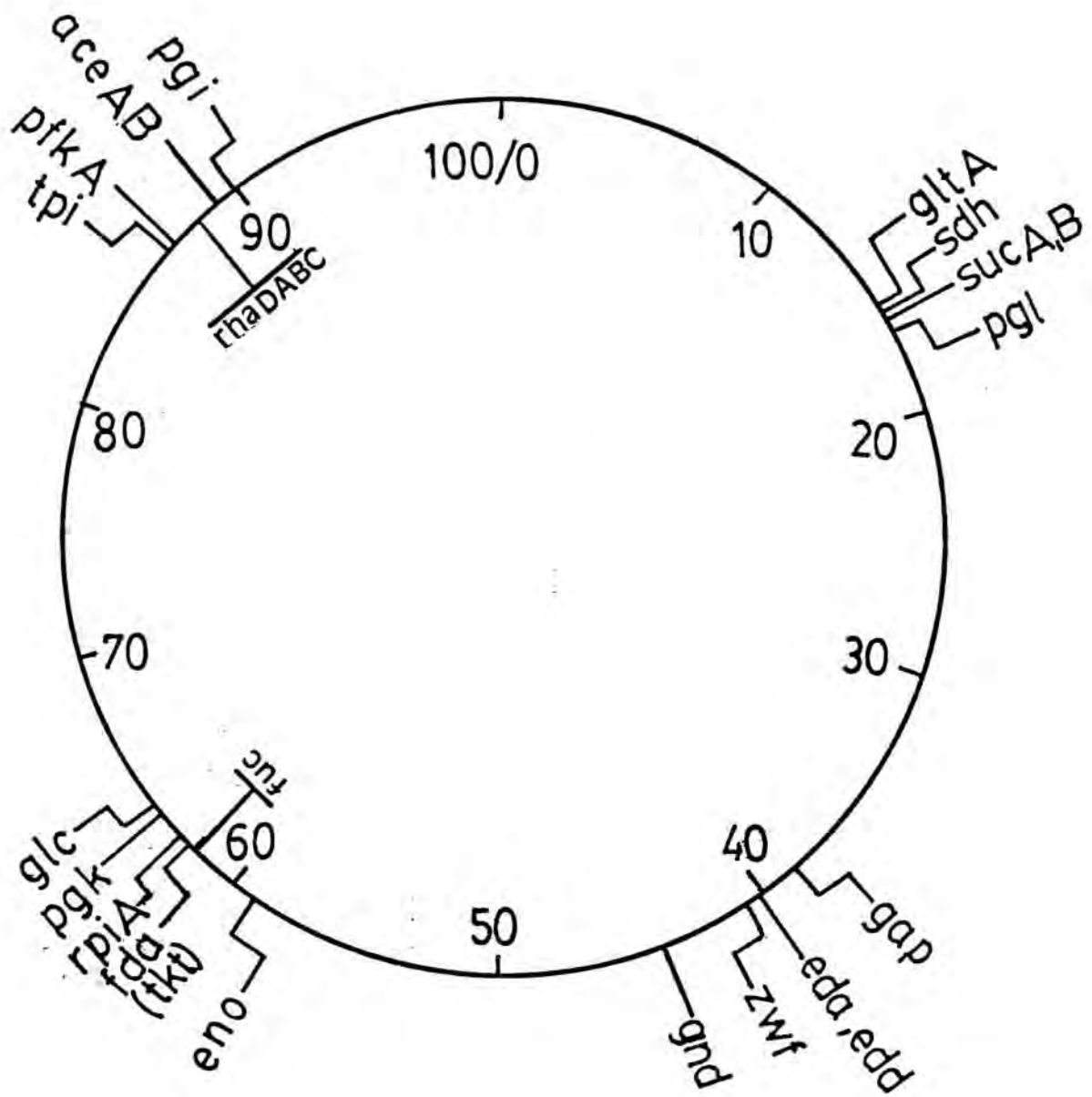
Así los genes que se detallan a continuación estaban colocados a 180° uno del otro: cysA-cysD; leuA-leuB; thiC-thiA,D; serA-serB; cysE-cysB y ribA-ribB.

Como ya se ha dicho, en E.coli algunos de los genes relacionados bioquímicamente, se encuentran situados en el cromosoma a 90° o 180°. Así se observa que los genes implicados en las vías de catabolismo de glucosa (vía Embden-Meyerhof, vía de las pentosas fosfato, la de Entner-Doudoroff, el ciclo del TCA y el "bypass" del glioxilato) se encuentran distribuidos en cuatro grupos dispuesto a 90/180° en el cromosoma de E.coli (figura 6). Cabe resaltar que este tipo de relación se puede también establecer entre enzimas que, por ejemplo, utilicen un cofactor especial: un par de enzimas que utilicen piridoxal fosfato podrían estar más relacionados entre sí que con los otros enzimas que intervienen en la misma ruta metabólica (153).

En algunos casos se observa que uno de los dos genes relacionados entre sí es activo mientras que el otro no se expresa. Esto puede ser debido a un proceso de evolución de la célula que permita relevar a un gen de su función original para que adquiriera una nueva función más útil para la célula. En E.coli B/r, el operón rbs que se expresa constitutivamente está situado en el minuto 2 y un operón rbs inducible está en el minuto 83 (10). En E.coli K-12 el operón rbs situado en el minuto 83 es también activo. Otro ejemplo es el gen argD que codifica para la enzima acetilornitina transaminasa situado en el minuto 73 en el cromosoma de E.coli K-12 y W. es reprimido por arginina, mientras que en el minuto 88 se halla localizado el gen argM inactivo, pero inducible por arginina (124,156, 157). Se cree que el gen inactivo es el que en realidad

FIGURA 6. MODELO DE DUPLICACION DEL CROMOSOMA DE E.
COLI.

Se muestra los cuatro agrupamientos de genes que comprenden la mayoría de genes del catabolismo de la glucosa. Situados en el mapa genético de E.coli. Así mismo se muestra la localización de los sistemas fuc y rha.



e tá en vias de evolución y encaminado a adquirir una nueva función.

Otros grupos de genes codifican dos proteínas ambos activos. Ejemplos de los mismos es el gen de la L- -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (glpA) y el de la D- -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (glpD) que se encuentran situados en el minuto 48 y 74 respectivamente del cromosoma de E.coli y en situación distante 90°. Los genes implicados en la síntesis del ácido diaminopimélico, están situados a 180° de tal modo que dapB, dapC y dapD se encuentran localizados entre los minutos 0 y 4 mientras que dapA y dapE se encuentran situados en el minuto 53. Los genes purE (minuto 12) y el purH (minuto 89), que codifican respectivamente la fosforibosil aminoimidazol carboxilasa y fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferasa, también se encuentran localizados, formando un ángulo de 90°. En semejante distribución, se encuentran los genes metC y metB que codifican paracistationasa y cistationina sintetasa se encuentran concretamente localizados en el minuto 64 y 87 respectivamente.

De los pares de genes localizados en el cromosoma de E.coli formando un ángulo de 90° o 180°, algunos codifican para la misma función, como es el caso de los genes tufA y tufB que codifican para el factor de elongación EF-Tu (49) o el de argI y argF, ambos para la ornitina transcarbamilasa. Otros pares de genes han divergido en su función. El gen pyrB que codifica para la aspartato transcarbamilasa está localizado en posición adyacente con el gen argI. Los genes ompC y ompF que codifican para proteínas que forman la membrana externa y que intervienen en fenómenos de difusión pasiva.

En Salmonella typhimurium, a parte del ejemplo mencionado con anterioridad de los sistemas fuc y rha se puede citar también, por su disposición formando 90°, los genes pck (fosfoenol piruvato carboxilasa) situado en el minuto 13 y el gen ppc (fosfoenol piruvato carboxiquinasa) situado en el minuto 88 (165).

Así, se podrían citar unos 125 ejemplos de pares de genes dispuestos formando 90° o 180° , y que se pueden agrupar en tres grupos principales: a) enzimas isofuncionales que catalizan la misma reacción; b) enzimas que intervienen en la misma ruta metabólica; c) cuya función o estructura celular está relacionada.

Mizobuchi y Saito, estudiaron enzimas con mecanismos de reacción similares, aunque las funciones metabólicas no estuviesen relacionadas, como, por ejemplo aspartato transcarbamilasa y ornitina transcarbamilasa y encontraron que un 60% de los genes correspondientes estaban separados por 45° o por un múltiplo de 45. El número de genes estudiados fué de 246. De estos experimentos se puede suponer que el cromosoma de E.coli había sufrido una duplicación original o sea tres en total.

En resumen, si la relación en la localización de los genes en el cromosoma (45° - 90° - 180°) no es un artefacto y tiene un significado biológico, sugiere que en el pasado, el cromosoma de E.coli sufrió dos o tres duplicaciones seguidas de una evolución divergente de cada una de las copias generadas. También es posible que esta localización definida, podría no reflejar un proceso evolutivo, sino, más bien algún tipo de ordenación impuesto por mecanismos de expresión génica o control celular, que evidentemente, no se habría elucidado todavía.

Otro tipo de duplicación genética y en la que no participa todo el cromosoma es la denominada "duplicación en tandem", que se produce al menos de dos formas diferentes, que implican las denominadas recombinaciones "legítima e ilegítima" (6,158).

Las del primer tipo se producen por recombinación normal entre secuencias idénticas o casi idénticas, localizadas en diferentes puntos del cromosoma. Este sistema depende de los mecanismos normales de recombinación (sistemas rec); la forma denominada "ilegítima" por el contrario no depende del sistema rec y se produce, por ejemplo, por procesos de "cross-over" entre copias de genoma que

no presentan homología, durante la replicación cromosómica (158).

Un segundo tipo de duplicación es producida por los elementos de inserción (secuencias de inserción y transposones) (30,48).

En este tipo de duplicación, una copia de la secuencia preexistente se inserta en una nueva posición dentro del cromosoma, ya sea en el mismo sentido o en sentido contrario, originando dos nuevos puntos de fusión o de unión (45).

Como ejemplo del segundo tipo de duplicación de genes cabe citar, las siete copias de los genes rRNA (rrn) situadas entre los minutos 70 y 80 del mapa cromosómico de E. coli (110). Las dos copias del gen de la ornitina transcabilasa (argI y argF) y las dos copias del gen glicil-tRNA (glyV y glyW).

En este punto, es interesante señalar que sea el que sea el mecanismo molecular de la duplicación genética, la evolución divergente de los pares de genes duplicados siguen y han seguido caminos evolutivos que han permitido adquirir nuevas funciones (113). De aquí se derivan dos consecuencias : un par de genes originados por duplicación, después de cambios mutacionales y divergencia en la función pueden codificar productos que muestren similitud estructural, o bien que el cambio producido en el transcurso de la evolución hayan sido tan profundos que sea muy difícil establecer relaciones estructurales entre ellos. Existen diferentes ejemplos de grupos o pares de genes que codifican para enzimas muy relacionados, que sugieren un origen evolutivo común. Un ejemplo de ello es el descrito por Truffa-Bachi y col (45,155). Estos autores encontraron que algunos de los enzimas de la "familia del ácido aspártico" en E. coli (aspartato quinasa I-homoserina deshidrogenasa I, aspartato quinasa II-homoserina deshidrogenasa II y aspartato quinasa III) muestran un alto grado de homología, compartiendo los mismos determinantes antigénicos.

El grado de reactividad cruzada entre los anticuerpos

utilizados (obtenidos contra el primer enzima) hacia los enzimas "heterólogos" es tan elevada que sugiere un origen evolutivo común, más que productos resultantes de una evolución convergente (45).

Otro ejemplo que se está estudiando desde hace varios años es la evolución de los enzimas relacionados con la vía del β -cetoadipato (32) representada en la figura 7.

El estudio de los enzimas de esta vía, iniciado por Ornston, se originó con la finalidad de corroborar o rechazar la teoría de la evolución de vías metabólicas, en la que se supone la existencia de una duplicación de un gen concreto y la adquisición subsiguiente de nuevas especificidades de sustrato. Si esto ocurría así, se debía producir una similitud estructural entre enzimas con funciones catalíticas similares, en contraposición con la teoría de Horowitz que suponía que los enzimas adyacentes en una vía metabólica eran similares en cuanto a estructura.

En 1970, Stanier y col. pusieron de manifiesto que no existía inmunidad cruzada entre dos enzimas adyacentes de la vía del β -cetoadipato en Pseudomonas putida, concretamente entre el enzima lactonizador y la muconolactona isomerasa (figura 7).

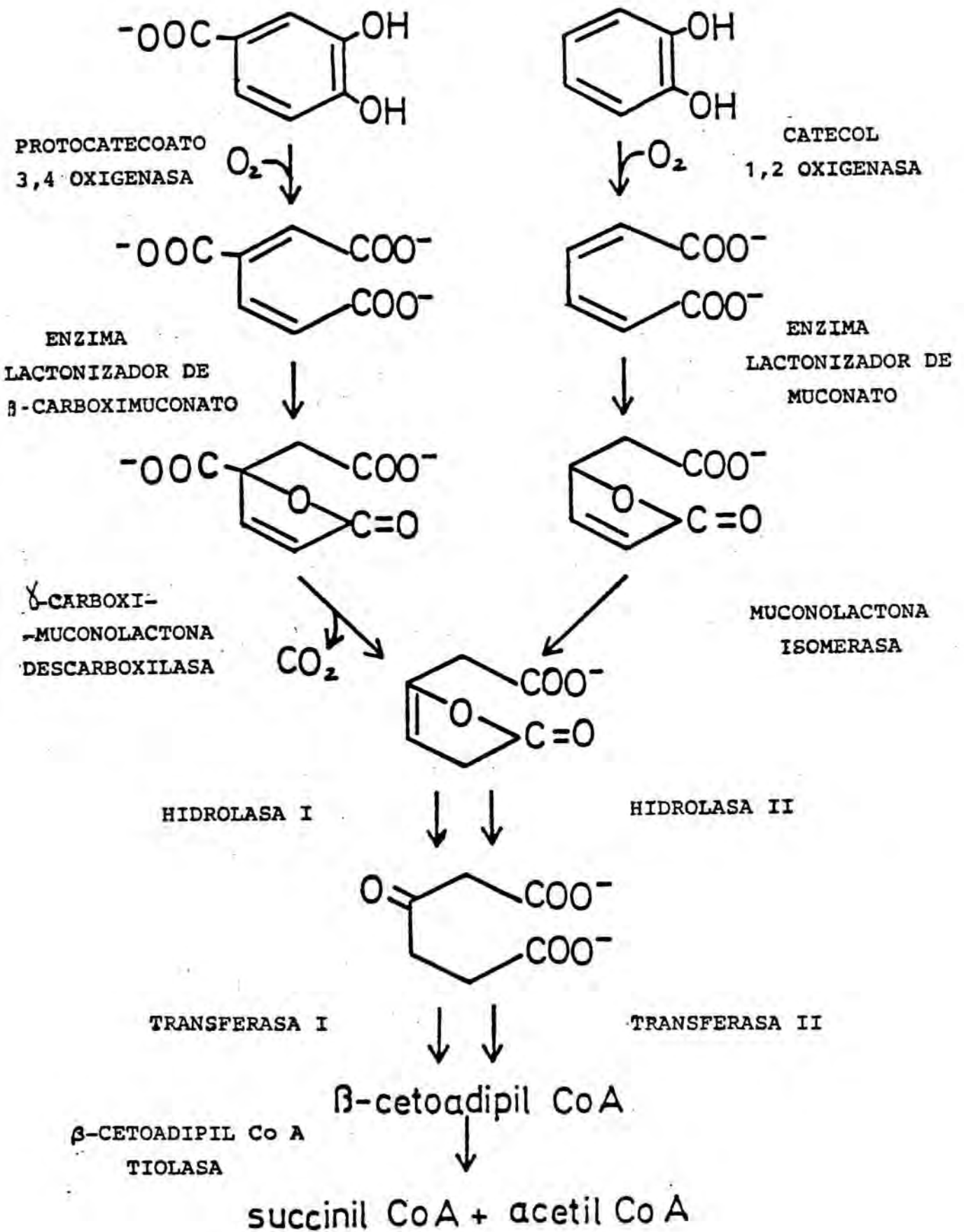
Posteriormente, trabajos realizados por Ornston y col. (104,166) demostraron la similitud entre enzimas que realizan funciones similares en las dos vías convergentes. Los dos enzimas lactonizadores poseen el mismo peso molecular, cristalizan de la misma forma y la secuencia amino terminal altamente similar. Lo mismo sucede con la muconolactona isomerasa y la carboximuconolactona descarboxilasa, e incluso entre la hidrolasa I (inducida solo por protocatato) y la hidrolasa II (inducida por cis,cis-muconato) en Acinetobacter.

Si bien existen numerosos trabajos similares al descrito, otros, aunque en menor cuantía apoyan la hipótesis de Horowitz.

Uno de los problemas, relacionados con esta teoría, es

FIGURA 7. RUTA METABOLICA DEL β -CETOADIPATO.

Se muestra la via del β -cetoadipato, usada normalmente en el metabolismo de los compuestos aromaticos.



que pasos sucesivos en una vía metabólica implican normalmente transformaciones químicas muy diferentes. Jeffcoat y Dagley (81) apuntan que esta posibilidad puede ser justificada si los mecanismos de reacción son similares a pesar de que existan cambios químicos muy diferentes. Así, la hidrolasa y la aldolasa rompen el D-gluconato de forma secuencial, demuestran tener pesos moleculares similares, así como pH óptimo, respuesta a inhibidores. Además, el hecho de que la hidrolasa posea cierta actividad aldolasa, les hizo presuponer que la duplicación y posterior divergencia de la hidrolasa dió lugar a la aldolasa. Parece pues, en este caso, que el enzima de una vía metabólica tenga su origen en el enzima que le precede metabólicamente.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDOS Y FAGOS

En este apartado se incluyen las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo..

La cepa de tipo salvaje utilizada fué una cepa de E.coli K-12, conocida también como cepa E-15 (11), que denominaremos cepa 1.

La cepa RaD 62 es un mutante de E.coli incapaz de utilizar la ramnosa como única fuente de carbono y energía como consecuencia de una mutación que afecta al gen de la ramnosa-1-fosfato aldolasa. Sus marcadores cromosómicos son: rha-10 , met B1 .

Estas cepas fueron cedidas gentilmente por E.C.C Lin, Department of Microbiology and Molecular Genetics. Molecular Medical School, Boston, U.S.A

La cepa ET1248 es un mutante de E.coli que lleva insertado en el operón de la ramnosa el fago lambda cI857 b515 b519 xis am Sam7. (116). Esta cepa fué cedida por D.G. Fraenkel Department of Microbiology and Molecular genetics . Harvard Medical School, Boston, U.S.A.

La cepa DF 903 es un mutante de E.coli que contiene una delección en el operón de la ramnosa y que se extiende desde pfkA hasta rha .(50)

La cepa NM528 es un mutante de E.coli lisogénica para el fago P2 , sus marcadores cromosómicos son: $r^{-}k$, $m^{+}k$ Sup F (P2 cox3).

La cepa JM222 es un mutante de E.coli KL-16 . Los marcadores cromosómicos son: $PeI^{-}suIII^{+}trp::Tn10$. Se ha utilizado en la selección de fagos recombinantes en función del tamaño de su genoma.

Estas cepas fueron cedidas por Jones Mortimer. Department of Biochemistry. University of Cambridge.U.K.

La cepa Q359 es una cepa derivada de E.coli K-12 que permite el crecimiento de recombinantes Spi^{-} del fago lambda. Sus características genotípicas más relevantes son: hsd R⁻k, hsd M⁺k, SupE ϕ 80 P2 . (82)

La cepa C600 conocida también como CR34, es una cepa

de E.coli y cuyos marcadores cromosómicos son los siguientes: F^- , thi-1, thr-1, lacY1, tonA 21, SupE 44, λ^- (8)

La cepa C600 recA es una cepa derivada de la cepa C600 en la que se ha introducido la siguiente mutación: recA1 Srl::Tn10.

La cepa JM109 es un mutante de E.coli que posee una delección en el operón de la lactosa. Sus características genotípicas son: recA1, end-A1, gyr-A96, thi-1, hsdR17, SupE 44, rel-A1, λ^- , $\Delta(\text{lac-proAB})$, [F^- , tra-D36, pro-AB, lacIqz Δ M15] (170)

Esta cepa fué cedida por J. Messing. Department of Biochemistry. University of Minnesota. U.S.A.

La cepa Frag 1, denominada también CGSC 4833 es un mutante de E.coli incapaz de metabolizar la ramnosa como fuente de carbono y energía, debido a una mutación en el enzima L-ramnosa isomerasa (rhaC). Sus marcadores cromosómicos más relevantes son; thi-1, rha-4, lacZ82, gal-33 λ^- (59)

La cepa AT 753, denominada también CGSC 4535, es un mutante de E.coli incapaz de metabolizar la ramnosa como única fuente de carbono y energía debido a una mutación en el enzima ramnulosa quinasa. Sus marcadores cromosómicos son: thi-1, ilv-1, argH1, met-B1, rha-1, lacY1 o lacZ4, gal-6, rpst-8, A9 o A17, λ^- , SupE 44.

La cepa BHB2690 es un mutante de E.coli lisógeno de lambda, utilizado en la obtención de extractos de empaquetamiento del bacteriófago lambda. Sus características genotípicas son: N205 recA⁻ [imm434, cIts, b2, red⁻, Dam, Sam/ λ] (76,77)

La cepa BHB2688 es una cepa de E.coli lisogénica de lambda. se ha utilizado en la obtención de extractos de empaquetamiento del bacteriofago lambda. Sus características genotípas son: N205 recA⁻ [imm434, cIts, b2, red⁻ Eam, Sam/ λ] (76,77)

Las cepas JA110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 son mutantes de E.coli K-12, obtenidos por inserción del transposón Tn5 en el locus rha.

Todas las cepas se mantuvieron en tubos o placas de "antibiotic medium" nº 3 a 0-4°C y se reseleccionaban periódicamente.

También se disponía de estas cepas en forma congelada en glicerol al 15% v/v a -80°C a fin de poder acceder al fenotipo original cuando fuera necesario.

Los fagos utilizados en el presente trabajo fueron:

Fago lambda :cI857 Sam7 utilizado como el bacteriofago de tipo salvaje.(138)

Fago lambda 467:lambda b221 cI857(ts), rec::Tn5 29(Am) p80(Am) utilizado en la obtención de mutantes de inserción (29)

Fago lambda L47.1 utilizado como vector en los procesos de clonaje de DNA foráneo. Los marcadores genéticos son: (SrI λ 1-2)^A, imm434cI⁻, NIN5, chiA131 (102)

El plasmido pUC18 se caracteriza por poseer dianas de restricción únicas en el polilinker de la galactosidasa.

El plasmido pBR322 tiene un tamaño molecular de 4,3 Kb. Sus marcadores selectivos son: Amp^R, tet^R. Se utilizó en el clonaje de DNA genómico de E.coli.

El plasmido Bluescript posee dianas únicas de restricción colocadas en posiciones contiguas, situadas entre los promotores T3 y T7. Sus marcadores selectivos son Amp^R, lac Z'.(54)

TABLA 3

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

| Cepa | Características | Origen |
|-----------|--|---|
| I (E15) | Fuc^+ , Prd^- | Cedida por E.C.C.Lin (Harvard Medical School)E.U.A |
| RaD62 | Met^- , Rha^- | Cedida por E.C.C.Lin (Harvard Medical School)E.U.A |
| DF903 | $\Delta(\underline{rha-pfkA})$ | Cedida por Fraenkel (Harvard Medical School)E.U.A |
| ET1248 | $rha:: cI857$ b515 b519 xisam Sam7 | Cedida por Fraenkel (harvard Medical School)E.U.A |
| NM528 | $r_k^- m_k^+$ sup $F(P_2^{cox3})$ | Cedida por Jones Mortimer (Cambridge University) U.K |
| Q359 | $hsd R^- k_1 hsdM^+ k$ SupE ϕ 80P2 | Dpto. Bioquímica, Fac. Farmacia. UB |
| C600 | F^- , $thi-1$ $thr-1$, leu B6 lac Y1 tonA 21, SupE 44, λ^- | Dpto. Bioquímica, Fac. Farmacia. UB |
| C600 recA | F^- , $thi-1$, $thr-1$, $leuB6$, $lacY1$ tonA 2, SupE 44, λ^- , $recA1$, $Sr1A::Tn10$ | Dpto. Bioquímica, Fac. Farmacia. UB |

(continuación de la tabla 3)

| | | |
|---------------------------------------|---|---|
| JM222 | <u>PeI⁻suIII⁺trp::Tn10</u> | Cedida por Jones Mortimer University of Cambridge.U.K. |
| JM109 | <u>recA1, endA1, gyrA 96 thi</u> <u>hsdR17, SupE 44, lacIqz M15</u> | Cedida por J.Messing University of Minissota.E.U.A |
| Frag1 | <u>thi-1, rha-4, lacZ82, gal-33</u> | <u>E.coli Genetic Stock Center</u> <u>Yale university.E.U.A.</u> |
| AT753 | <u>thi-1, ilv-1, argH1, metB1 rha-1</u> <u>lacY1 o lacZ4 gal-6 rpstA8 A9 o</u> <u>A17 - SupE 44</u> | <u>E.coli Genetic Stock Center</u> <u>Yale University.E.U.A</u> |
| BHB2688 | <u>N205 recA⁻ [imm434, cIts, b2, red⁻</u> <u>Eam, Sam/λ]</u> | Dpto.Bioquímica.Fac.Farmacia.U.B |
| BHB2690 | <u>N205 recA⁻ [imm434, cIts, b2, red⁻,</u> <u>Dam, Sam/λ]</u> | Dpto.Bioquímica.Fac.Farmacia.U.A |
| JM110, 111, 112, 113 114, 115, 116 | <u>rha::Tn5</u> | En el presente trabajo |

2.2. TECNICAS MICROBIOLOGICAS.

2.2.1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Para el crecimiento de las bacterias se emplearon medios de cultivo que constaban de un medio mineral mínimo al que se adicionaron las fuentes de carbono deseadas a partir de soluciones más concentradas.

La composición del medio mineral basal era:

| | |
|------------------------------------|--------------|
| NaH_2PO_4 | 34 mM |
| K_2HPO_4 | 64 mM |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 20 mM |
| FeSO_4 | 10^{-3} mM |
| MgSO_4 | 0,3 mM |
| ClCa_2 | 10^{-2} mM |

La solución se ajustaba a pH 7,0 con ClH .

Las fuentes de carbono se adicionaran a este medio basal inorgánico a fin de quedar a una concentración final de 60 mM carbono.

Los medios con hidrolizado de caseína se prepararan al 0,5%. Así mismo, las cepas que poseen una mutación en uno de los genes del operón rha y que por tanto no puedan crecer a expensas de la ramnosa presente en el medio, se harán crecer en medios mínimos que contengan caseína al 0,5% adicionados de 10 mM ramnosa como inductor.

Para el crecimiento en medio líquido completo se utilizaba un medio LB que contiene: 10 g de Triptona, 5 g de ClNa y 10 g de Extracto de levadura por litro de agua destilada.

Los medios McConkey utilizados para la selección de mutantes incapaces de crecer en ramnosa, se prepararon de la siguiente manera:

| | |
|---------------|--------|
| Peptona | 20 g/l |
|---------------|--------|

| | |
|-----------------------|----------|
| ClNa | 2,5 g/1 |
| Cristal violeta | 0,001g/1 |
| Rojo neutro | 0,05 g/1 |
| Ramposa | 10 mM |

El crecimiento de la cepa RaD 62 requiere, además de la fuente de carbono correspondiente, la presencia en el medio de metionina a una concentración 0,3 mM.

La cepa AT 753 denominada también CGSC 4535, se debía suplementar con tiamina (0,005 mM), isoleucina (0,3 mM), valina (0,3 mM), metionina (0,3 mM), arginina (0,6 mM).

La cepa Frag 1, denominada también CGSC 4833 requiere la presencia de tiamina (0,005 mM).

Los crecimientos aeróbicos se realizaron a 37°C en matraces erlenmeyers llenos en un 20% de su capacidad con el medio de cultivo correspondiente. Se incubaron en un agitador orbital a 250 r.p.m.

El crecimiento bacteriano de los cultivos se seguía por medida de la densidad óptica de los mismos a 420 nm para los medios mínimos y a 550 nm para los medios con LB, en un espectrofotómetro Shimadzu uv 240.

2.2.2. OBTENCION DE MUTANTES POR INSERCIÓN DE Tn 5

Para la obtención de mutantes de E.coli por inserción de Tn 5 se siguió el método descrito por Shaw y Berg. (136)

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular una colonia de la cepa a mutagenizar en 10 ml de LB. Crecer hasta una densidad óptica de 10^9 cel/ml.
- 2) Mezclar diferentes alícuotas del cultivo con el fago lambda L467, el cual lleva insertado el transposón Tn 5 en el gen rec. La multiplicidad de infección era de 0,5.
- 3) Incubar 30 minutos a 37°C. Parar la reacción por adición de 20 mM citrato sódico.

- 4) Sembrar una cantidad adecuada del cultivo bacteriano infectado en placas de McConkey + 10 mM Rha y kannamicina a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a fin de obtener 200-400 colonias por placa.
- 5) Seleccionar los mutantes por su fenotipo Rha⁻. Los mutantes incapaces de utilizar la ramnosa daran colonias blancas, ya que no acidifican el medio.
- 6) Comprobar por siembra en placa de LB y replicas sobre placas de ramnosa, que no son capaces de crecer en presencia de este azúcar, como única fuente de carbono y energía.

ANOTACIONES:

-La presencia de kannamicina en el medio, permite el crecimiento de las bacterias que han incorporado el transposón en algún lugar del cromosoma. Las colonias blancas son las que han incorporado el transposón dentro del operón de la ramnosa de tal forma que evita la expresión de un gen y por tanto la síntesis de alguna proteína necesaria para su metabolismo.

2.3. PREPARACION DE EXTRACTOS CELULARES

Habitualmente los cultivos se recogían al final de la fase exponencial con excepción de casos muy concretos que ya se especificarán.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Recoger las células por centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C.
- 2) Resuspender el sedimento celular con una solución amortiguadora de 10 mM fósforo sódico, 10 mM β -mercaptoetanol, 1 mM EDTA pH 7,3
- 3) Centrifugar. Resuspender el sedimento en un volumen 4 veces su peso húmedo.
- 4) Someter la suspensión celular a una desintegración ultrasónica en un sonicador MSE de 150 vatios, a una amplitud de onda que oscila entre 12-24 micrones según el volumen de muestra, a razón de 30 segundos por mililitro de suspensión, manteniendo las células entre 0-4°C mediante un baño de agua y sal a -20°C
- 5) Centrifugar los extractos a 30.000 x g durante 30 minutos a 4°C.
- 6) Recoger el sobrenadante que es lo que se denominará extracto celular.

ANOTACIONES

Cuando el volumen a sonicar es grande, se interrumpe el proceso periódicamente para evitar la posible inactivación enzimática por aumento incontrolado de la temperatura.

2.4. TECNICAS DETERMINATIVAS

2.4.1. DETERMINACION DE PROTEINA

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (100), que permite detectar bajas concentraciones de proteína del orden de 20 a 200 microgramos por mililitro.

2.4.2. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

2.4.2.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD L-RAMNOSA ISOMERASA.

La determinación de la actividad del enzima L-ramnosa isomerasa, se realizó por determinación colorimétrica de la ramnulosa formada al actuar el enzima sobre la ramnosa. (9)

PROCEDIMIENTO:

- 1) Preparar una mezcla de reacción que contenga 2 mM ramnosa, 10 mM Cl_2Mg , 20 mM Tris-ClH pH 7,6 en 1 ml de reacción.
- 2) Iniciar la reacción por adición del enzima. Incubar a 37°C durante 10 minutos.
- 3) Parar la reacción por adición de 1,0 ml de ácido tricloro acético al 10%.
- 4) Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos, para eliminar la proteína precipitada.
- 5) Tomar 1 ml del sobrenadante y proceder a la determinación de la ramnulosa formada. Para ello adicionar 0,2 ml de una solución de cisteina-ácido clorhídrico al 1,5%
- 6 ml de SO_4H_2 al 70% y 0,2 ml de una solución alcohólica de carbazol al 0,12% (p/v).
- 6) Dejar en reposo 2 horas y proceder a la lectura de la absorbancia a 560 nm.

7) Preparar una curva patrón, a partir de una solución de tagatosa (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$) y tratar los puntos de igual forma que las muestras a analizar.

ANOTACIONES:

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de ramnulosa en 10 minutos y a 37°C.

2.4.2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD L-RAMNOSA PERMEASA.

La actividad L-ramnosa permeasa se determinó por medida de la velocidad de incorporación de ^{14}C -ramnosa.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 5 ml de medio mínimo que contenga 0,5% CAA adicionado de 10 mM ramnosa como inductor.
- 2) Crecer las células a 37°C. Recoger el cultivo por centrifugación a mitad de la fase exponencial.
- 3) Lavar las células con SM. Centrifugar a 8.000 x g y resuspender el sedimento en un volumen de SM hasta obtener 10^9 células por ml. Adicionar cloranfenicol a una concentración final de 170 microgramos por ml.
- 4) Preparar la solución de L- ^{14}C -Ramnosa a una concentración 0,2 mM ramnosa y una radioactividad específica de 0,80 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.
- 5) Iniciar la reacción por mezcla de 0,5 ml de la suspensión celular con 0,5 ml de la solución que contiene la ramnosa radioactiva.
- 6) Parar la reacción a diferentes tiempos, por filtración en membrana Millipore de 0,45 μm , de una alícuota de 0,1 ml de la mezcla de reacción.

- 7) Lavar inmediatamente el filtro con 5 ml de SM.
- 8) Pasar el filtro a un vial y añadir 10 ml de una solución de contaje (BRAY) que contiene 0,4% (p/v) PPO 0,02% (p/v) POPOP, 6% (p/v) naftaleno, 2% (v/v) metanol 88% (v/v) dioxano y 10% (v/v) etilenglicol.(138)

2.5. OBTENCION Y PURIFICACION DE DNA GENOMICO DE E.COLI

Para la obtención de DNA genómico se ha utilizado la cepa de E.coli K-12 denominada E-15 y que designaremos como cepa 1 (12)

2.5.1. OBTENCION DE DNA GENOMICO DE E.COLI A GRAN ESCALA

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 200 ml de LB que contenga glucosa al 1% (P/V). Incubar a 37°C con vigorosa agitación hasta una densidad del cultivo de 2×10^8 cel./ml ($A_{600} = 0,6$)
- 2) Recoger las células por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C .
- 3) Resuspender el sedimento celular en 4,8 ml de una solución que contenga 0,6 M sacarosa, 0,05 M Tris-ClH pH 8,0 y adicionar 0,69 ml de una solución 0,25 M Tris pH 8,0 que contenga 10 mg/ml de lisozima (la solución de lisozima debe prepararse de forma extemporánea) .
- 4) Agitar suavemente durante 30 segundos a 37°C y dejarlo en hielo durante 5 minutos.
- 5) Adicionar 2,6 ml de una solución previamente enfriada a 4°C de 0,25 M EDTA pH 8,0 , mezclar suavemente y dejar actuar durante 5 minutos.

El EDTA actúa secuestrando el Ca^{2+} de la pared bacteriana, facilitando la acción de la lisozima.

- 6) Adicionar, manteniendo una temperatura de 4°C , 5,4 ml de una solución de 0,05 M Tris, 0,063 M EDTA pH 8,0 que contenga tritón X-100 al 2%. Mezclar suavemente y esperar 20 minutos para que todas las células puedan lisarse.
- 7) Añadir un volumen igual de fenol que contenga 8-hidroxiquinoleína al 0,1 % , saturado con una solución 10 mM Tris-ClH pH 8,0 , 1 mM EDTA y un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 V/V). Mezclar por inversión varias veces.

- 8) Centrifugar 5 minutos a 10.000 x g . Transferir la fase acuosa (fase superior) a otro tubo.
- 9) Volver a extraer con fenol/cloroformo hasta que la interfase quede nítida.
- 10) Extraer con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 V/V). (20 ml) y transferir de nuevo la fase superior acuosa a otro tubo.
- 11) Adicionar ClNa 5 M hasta obtener una concentración final de 0,5 M .
- 12) Añadir 2 volúmenes de Etanol frío (0-4°C). Mezclar suavemente por inversión y dejarlo tapado toda la noche a 4°C con el fin de que precipite todo el DNA.
- 13) Centrifugar a 16.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante por decantación. Lavar el sedimento con etanol del 70% (0-4°C) y volver a centrifugar.
- 14) Decantar el sobrenadante y dejar secar el sedimento a 37°C durante 15-30 minutos.
- 15) Resuspender el sedimento en 10 ml de TE .
- 16) Sembrar 1 microlitro de la solución de DNA en un gel de agarosa al 0,7% con el fin de poder valorar el proceso de obtención del DNA.

ANOTACIONES:

-Para la obtención de DNA genómico se debe proceder en primer lugar a la lisis de la bacteria, de forma que todo el contenido celular sea liberado al exterior. Para ello es muy importante asegurarnos de que la lisis celular se produce por observación de un aumento de viscosidad del medio. Seguidamente se debe proceder a precipitar las proteínas y separarlas del DNA.

-Uno de los principales problemas en la obtención del DNA de E.coli es que se produce la ruptura de las hebras con mucha facilidad, lo que en ocasiones lleva a la obtención de un DNA de bajo EM .Por este motivo y durante todo el proceso deberá agitarse con sumo cuidado.

-La 8-hidroxiquinoleína se adiciona al cloroformo por-

que dicha mezcla evita la formación de espuma durante los procesos de extracción a la vez que facilita la separación de las dos fases.

2.5.2. PURIFICACION DEL DNA GENOMICO EN GRADIENTE DE ClCs

Cuando se necesita obtener una preparación de DNA de alta calidad, es imprescindible la separación de éste de restos proteicos y del propio RNA. Esto se consigue con gran eficacia mediante la utilización de gradientes discontinuos en ClCs.(102)

A no ser que se indique lo contrario, todos los pasos que se detallan a continuación se realizarán con soluciones previamente enfriadas a 4°C.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Añadir a los 10 ml de solución de DNA obtenido según el apartado 2.5.1., 10 g de ClCs, lo que deberá producir un aumento en el volumen de la solución hasta 15 ml .
- 2) Disolver bien el ClCs y añadir 10 μ l de una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml .Determinar la densidad final de la preparación por pesada, en balanza de precisión, que debe ser de 1,55 g/cm³.
- 3) Distribuir la muestra en dos tubos de polipropileno de 8 ml. Equilibrar los tubos hasta una diferencia de peso inferior a 50 mg.
- 4) Ultracentrifugar las muestras a 122.000 x g durante 60 horas a 25°C.
- 5) Visualizar la banda de DNA con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de onda larga (360 nm).
- 6) Extraer la banda por aspiración. Para ello se introducirá una pipeta pasteur conectada a una jeringa, a la altura de la banda y se succionará hasta que la banda desaparezca.
- 7) Repartir el volumen extraído (1,5 ml aproximadamente) en 2 tubos de microcentrífuga.

- 8) Extraer el bromuro de etidio de la solución por adición de 1 volumen de isopropanol. Mezclar las fases y Centrifugar.
- 9) Desechar la fase alcohólica de color rosada debido a la presencia del bromuro de etidio.
- 10) Repetir los pasos 8 y 9 varias veces hasta la total desaparición del color rosado en la fase acuosa.
- 11) Transferir la fase acuosa a un tubo Corex y añadir 2 volúmenes de agua con el fin de diluir el ClCs.
- 12) Adicionar 6 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar suavemente por inversión. Dejar a -20°C durante una noche.
- 13) Centrifugar a $14.000 \times g$ para obtener el sedimento de DNA. Lavar con etanol al 70% y volver a centrifugar.
- 14) Secar el sedimento a 37°C durante 15-30 minutos y resuspendirlo en 2 ml de TE pH 8,0 .
- 15) Cuantificar el DNA por espectrofotometría, asumiendo que una absorbancia de 1 a 260 nm corresponde a una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de doble cadena.

ANOTACIONES:

-El rendimiento obtenido fué de 3 mg de DNA a partir de 200 ml de cultivo. Se observó además que el DNA obtenido era de elevado peso molecular y que era sensible al tratamiento con endonucleasas de restricción.

2.5.3. OBTENCION DE DNA GENOMICO A PEQUEÑA ESCALA

La posibilidad de obtener DNA genómico a pequeña escala es de gran interés porque se evita el manejar grandes volúmenes de solución y porque por regla general, suelen estar diseñados de forma que se pueden procesar varios DNAs obtenidos de diferentes clones, simultáneamente.

Así se disponía de varios mutantes obtenidos por inserción del transposón Tn 5 y cuya preparación de DNA se realizó según el método descrito por Scheif (133). El DNA obtenido por este método es lo suficientemente puro para

que pueda ser utilizado en procedimientos que requieran la acción de endonucleasas de restricción.

PROCEDIMIENTO:

Todos los pasos que se detallarán a continuación se realizarán con soluciones previamente enfriadas a 4°C.

- 1) Inocular 5 ml de LB con una colonia de la bacteria. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2) Centrifugar 4,5 ml del cultivo a 8.000 × g durante 5 minutos.
- 3) Resuspender el sedimento en 15 μ l de una solución de lisis que contiene 0,15 M ClNa, 0,1 M EDTA pH 8,0 y lisozima a una concentración de 2 mg/ml.
- 4) Incubar a 37°C durante 10-20 minutos para que todas las bacterias puedan lisarse. Si la lisis se produce correctamente se debe observar un incremento de viscosidad del medio.
- 5) Congelar la muestra en nieve carbónica-etanol.
- 6) Añadir a las células congeladas 125 μ l de una solución que contiene 1% triton X-100, 0,1 M ClNa, 0,1 M Tris-ClH pH 9,0 . Agitar suavemente mientras las células se descongelan.
- 7) Adicionar 150 μ l de fenol y agitar bien para que se mezclen las fases.
- 8) Centrifugar 3 minutos a 8.000 × g.
- 9) Recuperar la fase superior acuosa que es la que contiene el DNA. Añadir 300 μ l de etanol absoluto. Mezclar bien y mantener la muestra a -70°C durante una noche, para que todo el DNA precipite.
- 10) Centrifugar 10 minutos a 15.000 × g.
- 11) Resuspender el sedimento en 100 μ l de tampón SSC x 0,1. La baja concentración de sal del tampón favorece la disolución del DNA. Más tarde añadir 5 μ l de tampón SSC x 20.
- 12) Adicionar 4 μ l de RNasa A preparada a una concentración de 2,5 mg/ml. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

- 13) Añadir 100 μ l de fenol previamente saturado con SSC. Mezclar bien y centrifugar 3 minutos a 8.000 x g.
- 14) Recuperar la fase acuosa y tratar el DNA tal y como se indica en los puntos 9 y 10.
- 15) Resuspender el sedimento obtenido en 50 μ l de TE.
- 16) Separar una alícuota y someterla a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, para comprobar la calidad del DNA obtenido.

ANOTACIONES:

-Como ya se ha comentado en el apartado 2.5.2 el DNA genómico, debido al gran tamaño de sus hebras, se rompe con gran facilidad, por esto la agitación debe realizarse suavemente durante todo el proceso de obtención. Todas las preparaciones de DNA obtenidas por este método superaron las 10 Kb, y todas ellas fueron lo suficientemente puras, siendo todas ellas sensibles a la acción de las endonucleasas de restricción.

2.6. OBTENCION Y PURIFICACION DE DNA DEL BACTERIOFAGO λ

La obtención del DNA del bacteriófago lambda, conlleva inicialmente la obtención de gran cantidad de partículas fágicas. El enriquecimiento de los fagos se realizó mediante lisis confluyente de las bacterias infectadas en medio líquido. Inicialmente la concentración de bacteriófagos es baja, de tal forma que solo una parte de las bacterias eran infectadas y las restantes podían continuar dividiéndose durante varias horas. Sin embargo varios ciclos de infección llevan a un aumento en el número de fagos de tal forma que todas las bacterias pueden ser infectadas, produciéndose la lisis de las mismas.

El método utilizado es el descrito por Blattner y col. (20)

2.6.1. OBTENCION DE FAGOS A PEQUEÑA ESCALA

Se han descrito un gran número de métodos que permiten la obtención de DNA fágico a partir de una sola placa de lisis. Estos procedimientos llevan a la obtención, en suficiente cantidad, de DNA de pureza suficiente para el análisis mediante endonucleasas de restricción.

La obtención de fagos se puede realizar por cultivo en placa o bien en medio líquido de las bacterias infectadas. Aquí, se describirá el cultivo en medio líquido por ser el que se ha utilizado para el análisis de los clones recombinantes. (94)

PROCEDIMIENTO:

- 1) Aislar los fagos de una placa de lisis. Colocarlos en un tubo que contenga 1 ml de SM al que se ha adicionado una gota de cloroformo. Incubar a 4°C durante 4-6 horas para que las partículas fágicas puedan difundir del agar al medio líquido.
- 2) Mezclar $1,6 \times 10^8$ células bacterianas (en fase estacio-

- naria) con 3×10^6 fagos. Incubar 15 minutos a 37°C .
- 3) Adicionar 4 ml de LB. Incubar a 37°C durante 9-10 horas en constante agitación. La lisis se observará por disminución de la absorbancia a 600 nm.
 - 4) Añadir al cultivo 0,1 ml de cloroformo. Incubar 15 minutos a 37°C . Transferir el lisado a un tubo de polipropileno de 8 ml .Centrifugar a $8.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C .
 - 5) Recoger el sobrenadante y proceder a la obtención de DNA según se indica en el apartado 2.6.4.

ANOTACIONES

Si bien se puede partir de una calva de lisis, siempre que sea posible es aconsejable partir de un lisado del que se conozca el título, ya que es muy importante el número de bacterias y fagos, así como la relación entre ellas.

2.6.2. OBTENCION DE FAGOS A GRAN ESCALA.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 100 ml de LB con una colonia de la cepa a infectar. Incubar durante una noche a 37°C con vigorosa agitación.
- 2) Leer la absorbancia del cultivo y calcular la concentración de células presentes, asumiendo que una absorbancia de 1 a 600 nm equivale a 8×10^8 células/ml
- 3) Tomar cuatro alícuotas del cultivo conteniendo cada una de ellas 10^{10} células. Centrifugar a $4.000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 3 ml de lambda dil.
- 5) Añadir el bacteriófago y mezclar rápidamente. Incubar a 37°C durante 20 minutos, agitando de forma intermitente.

6) Inocular cada una de las alícuotas infectadas en 500 ml de LB. Incubar a 37°C con vigorosa agitación.

La lisis se observa después de 9-12 horas de incubación. Si la lisis se produce eficientemente, se observarán gran cantidad de células rotas, a la vez que la turbidez del medio desaparece.

7) Si la lisis no es aparente se analizará una alícuota del cultivo para evidenciar el crecimiento del bacteriófago. Con este fin se separarán dos alícuotas del cultivo de 1 ml cada una y se colocan en sendos tubos. Incubar ambos tubos a 37°C durante 5-10 minutos. Si se observa un aclaramiento del cultivo tratado con cloroformo se procederá como si la lisis hubiera sido total.

8) Añadir 10 ml de cloroformo a cada erlenmeyer y continuar la incubación durante 30 minutos a 37°C.

9) Centrifugar a 8.000 x g durante 10 minutos con el fin de eliminar los restos celulares.

10) Recoger el sobrenadante que contiene los fagos y guardarlo a 4°C hasta proceder a la purificación de los mismos.

2.6.3. PURIFICACION DE LOS FAGOS

La purificación de las partículas fágicas se realizó según el método descrito por Davis y col. (53)

Para ello se procederá en primer lugar a sedimentar los fagos por centrifugación a 25.000 r.p.m. durante 2 horas a 4°C en un rotor Beckman Ti-40, resuspenderlos más tarde en 1 ó 2 ml de lambda dil y dejarlos el tiempo suficiente a 4°C para su completa resuspensión.

Una vez concentradas las partículas fágicas, se purificarán, por centrifugación en gradiente discontinuo en ClCs.

PROCEDIMIENTO:

1) Preparar cuatro soluciones de ClCs de densidad 1,3

1,4 , 1,6 , 1,9 g/cm³ según la pauta descrita a continuación:

| DENSIDAD (g/cm ³) | ClCs (g) | VOLUMEN LAMBDA DIL C.S.P |
|----------------------------------|-------------|-----------------------------|
| 1,3 | 39,5 | 100 ml |
| 1,4 | 53,5 | 100 ml |
| 1,6 | 81,2 | 100 ml |
| 1,9 | 192,0 | 100 ml |

- 2) Añadir en un tubo de polipropileno de 8 ml de capacidad 3 ml de una solución de ClCs de densidad 1,4 g/ml y finalmente 1 ml de la suspensión fágica (densidad aproximada de 1 g/ml).
- 3) Centrifugar a 35.000 r.p.m. en un rotor Beckman Ti-40 durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 4) Extraer por aspiración los fagos situados en la interfase formada por la solución de densidad 1,6 y la de densidad 1,4, con ayuda de una pipeta pasteur previamente conectada a una jeringa.
- 5) Mezclar la suspensión fágica obtenida después del primer gradiente (densidad aproximada 1,5 g/cm³) con un volumen igual de una solución saturada de ClCs (densidad 1,9 g/cm³).
- 6) Depositar la mezcla obtenida (densidad 1,7 g/cm³) en un tubo de polipropileno de 8 ml. Añadir 4 ml de una solución de ClCs de densidad 1,6 g/cm³ y seguidamente el volumen necesario de la solución de ClCs de densidad 1,3 g/cm³ para alcanzar los 8 ml.
- 7) Centrifugar a 35.000 r.p.m. durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 8) Extraer por aspiración los fagos situados en la interfase formada por la solución de densidad 1,6 g/cm³ y la de densidad 1,3 g/cm³.
- 9) Guardar la suspensión fágica así obtenida en un tubo

de microcentrífuga a 4°C.

ANOTACIONES:

-La utilización de dos gradientes de ClCs discontinuos ,uno descendente y otro ascendente, lleva a la obtención de partículas fágicas altamente purificadas.

2.6.4. OBTENCION DE DNA FAGICO

Para la obtención del DNA se debe proceder a la ruptura de la cápsula del bacteriófago y a la liberación de su material genético. Para ello se utilizó el método descrito por Thomas y Davis (172).

PROCEDIMIENTO:

- 1) Poner en un tubo de microcentrífuga 160 microlitros de la suspensión fágica. Añadir 0,1 volumen de una solución 2 M Tris-ClH pH 8,0 y 0,05 volúmenes de una solución 0,5 M EDTA pH 8,5
- 2) Adicionar 1 volumen de formamida e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Si la suspensión fágica es la obtenida por gradiente en ClCs se debe añadir 1 volumen de agua con el fin de evitar, por dilución, la precipitación posterior del ClCs.
- 4) Adicionar 6 volúmenes de etanol, previamente enfriado a 4°C. Mantener a -20°C para favorecer la precipitación del DNA.
- 5) Centrifugar a 15.000 x g durante 10 minutos.
- 6) Lavar el sedimento con etanol del 70% frío y volver a centrifugar.
- 7) Secar el sedimento a 37°C durante 15 minutos y resuspender el DNA con 100 microlitros de TE.
- 8) Comprobar el tamaño y cantidad del DNA obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de 1 microlitro de la solución.

ANOTACIONES:

Si el DNA se obtiene a partir de una suspensión fágica, purificada por centrifugación en gradiente discontinuo de ClCs, no se deben observar trazas de RNA.

2.7. DIGESTION DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION

Las endonucleasas de restricción son enzimas aislados principalmente de procariotas, que reconocen secuencias específicas en el DNA de doble cadena.

Durante la digestión deben controlarse parámetros tales como la temperatura, tiempo de incubación, composición del tampón, así como la relación existente entre los microgramos de DNA a digerir y las unidades de enzima. Si bien los enzimas son muy sensibles a pequeños cambios en la temperatura de incubación, no se ven tan afectados por la composición del tampón. Para la mayoría de digestiones de DNA suelen utilizarse basicamente 3 tampones conteniendo en todos los casos 10 mM SO_4Mg y 1 mM DTT y a) "alta concentración (100mM ClNa, 50 mM Tris-ClH pH 7,4)" , b) "media concentración (50 mM ClNa, 10 mM Tris-ClH pH 7,4)" , c) "baja concentración (10 mM Tris-ClH pH 7,4)" (53)

Hay enzimas como el denominado SmaI que requieren un tampón especial: 20 mM ClK, 10 mM Tris-ClH pH 8,0, 10 mM SO_4Mg , 1 mM DTT.

Los enzimas utilizados en el presente trabajo fueron BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI, Sall KpnI, PvuI, PvuII, BglI, PstI, SmaI, SacI, XhoI suministrados por las firmas Boehringer y Cultek.

En determinadas condiciones de reacción, algunos enzimas pueden presentar una actividad secundaria ("Star activity") por la que se altera el reconocimiento de su correspondiente diana de restricción. Esta alteración puede evitarse eludiendo ciertas condiciones de incubación que la inducen, entre las que pueden destacarse la concentración de glicerol (superiores al 10%) y una alta relación unidades de enzima/microgramo de DNA. Dado que los enzimas de restricción comercializados se suministran en una solución al 50% glicerol (que actúa como crioprotector) y con objeto de evitar una posible ac-

tividad secundaria, la relación volumen de reacción/volumen de enzima añadido nunca fué inferior a 10. Por otra parte, la relación de unidades de enzima/microgramo de DNA no superó en ningún caso el valor de 25.

Las condiciones óptimas de digestión para los diferentes enzimas de restricción se detallan en la tabla 4

PROCEDIMIENTO:

- 1) Poner un volumen de DNA adecuado en un tubo de microcentrífuga, de forma que la concentración de DNA a digerir sea inferior a 1 microgramo.
- 2) Añadir una cantidad adecuada del tampón de digestión 10 veces concentrado correspondiente a la fuerza iónica del enzima utilizado.
- 3) Adicionar un exceso de 2 veces la cantidad de enzima necesaria.
- 4) Completar con agua hasta alcanzar el volumen de reacción adecuado.
- 5) Mezclar e incubar durante 2 horas a la temperatura adecuada.
- 6) Parar la reacción añadiendo EDTA 0,5 M pH 8,0 a una concentración final de 10 mM o bien por simple congelación.
- 7) Comprobar la digestión por electroforesis en gel de agarosa, para ello tomar una alícuota de la mezcla de digestión y prepararla según el apartado 2.17.

Cuando se ha de digerir el DNA con dos enzimas de restricción, las dos digestiones se pueden hacer al mismo tiempo, si los dos enzimas trabajan a la misma fuerza iónica. Si trabajan con fuerza iónica diferente se procede de la siguiente manera:

- 1) Digerir el DNA con el enzima que utilice el tampón de fuerza iónica más baja.

(continuación tabla 4.)

| Enzima | Sal | Temp. (37°C) | Actividad después de 10 min a 37°C | Secuencia | n° de dianas | |
|----------------|------|-----------------|--|---------------------------------|--------------|--------|
| | | | | | λ | pBR322 |
| <u>HindIII</u> | med | 37 | + | A'AGCTT | 6 | 1 |
| <u>HinfI</u> | med | 37 | | G'ANTC | >50 | 10 |
| <u>HpaI</u> | low | 37 | | GTT'AAC | 11 | 0 |
| <u>HpaII</u> | low | 37 | | C'CGG | >50 | 26 |
| <u>HphI</u> | low | 37 | | GGTGANNNNNNNN' CCACTNNNNNNN' | >50 | 12 |
| <u>KpnI</u> | low | 37 | - | GGTAC'C | 2 | 0 |
| <u>MboI</u> | high | | | 'GATC | >50 | 22 |
| <u>MboII</u> | low | 37 | | GAAGANNNNNNNN' CTTCTNNNNNNN' | >50 | 11 |
| <u>MnlI</u> | high | 37 | | CCTC | >50 | 26 |
| <u>MspI</u> | low | 37 | | C'CGG | >50 | 26 |
| <u>MstI</u> | | | | TGCGCA | >10 | 4 |
| <u>PstI</u> | med | 30 | - | CTGCA'G | 18 | 1 |
| <u>PvuI</u> | high | 37 | + | CGATCG | 3 | 1 |
| <u>PvuII</u> | med | 37 | | CAG'CTG | 15 | 1 |
| <u>RsaI</u> | med | 37 | | GT'AC | >50 | 3 |
| <u>SacI</u> | low | 37 | | GAGCT'C | 2 | 0 |
| <u>SacII</u> | low | 37 | | CCGC'GG | 4 | 0 |
| <u>SacIII</u> | high | | | ACGT | >10 | 6 |
| <u>SalI</u> | high | 37 | + | G'TCGAC | 2 | 1 |
| <u>Sau3AI</u> | med | 37 | | 'GATC | >50 | 22 |
| <u>Sau96I</u> | med | 37 | | G'GNCC | >30 | 15 |
| <u>SmaI</u> | (1) | 37 | | CCC'GGG | 3 | 0 |
| <u>SstI</u> | low | 37 | | GAGCT'C | 2 | 0 |
| <u>SstII</u> | low | 37 | | CCGC'GG | 3 | 0 |
| <u>SstIII</u> | high | | | ACGT | >10 | 6 |
| <u>TaqI</u> | low | 65 | + | T'CGA | >50 | 7 |
| <u>ThaI</u> | low | 60 | + | CG'CG | >50 | 23 |
| <u>XbaI</u> | high | 37 | | T'CTAGA | 1 | 0 |
| <u>XhoI</u> | high | 37 | - | C'TCGAG | 1 | 0 |
| <u>XmaI</u> | low | 37 | | C'CCGGG | 3 | 0 |

TABLA 4 : CONDICIONES DE DIGESTION PARA LOS DIFERENTES ENZIMAS
 DE RESTRICCIÓN.

| Enzima | Sal | Temp. (°C) | Actividad después de 10min a 37°C | Secuencia | n° de dianas | |
|---------------|------|---------------|---|---|--------------|--------|
| | | | | | λ | pBR322 |
| <u>AccI</u> | med | 37 | | GT' (^{AG} _{CT})AC | 7 | 2 |
| <u>AluI</u> | med | 37 | | AG'CT | >50 | 16 |
| <u>AsuI</u> | | | | G'GNCC | >30 | 15 |
| <u>AvaI</u> | med | 37 | | G'PyCGPuG | 8 | 1 |
| <u>AvaII</u> | med | 37 | | G'G(^A _T)CC | >17 | 8 |
| <u>AvrII</u> | low | 37 | | CCTAGG | 2 | 0 |
| <u>BalI</u> | | | | TGG'CCA | 15 | 1 |
| <u>BamHI</u> | med | 37 | + | G'GATCC | 5 | 1 |
| <u>BbvI</u> | low | 37 | | GC(^T _A)GC | >30 | 21 |
| <u>BclI</u> | med | 60 | + | T'GATCA | 7 | 0 |
| <u>BglI</u> | med | 37 | | GCCNNNN'NGGC | 22 | 3 |
| <u>BglII</u> | low | 37 | | A'GATCT | 5 | 0 |
| <u>BpaI</u> | | | | GT' (^C _A) (^G _T)AC | 7 | 1 |
| <u>BpuI</u> | | | | | 6 | 2 |
| <u>BstEII</u> | med | 60 | + | G'GTNACC | 11 | 0 |
| <u>BstNI</u> | low | 60 | + | CC' (^A _T)GG | >35 | 6 |
| <u>ClaI</u> | | | | AT'CGAT | 12 | 1 |
| <u>DdeI</u> | med | 37 | | C'TNAG | >50 | 8 |
| <u>EcoRI</u> | high | 37 | - | G'A [*] AATTC | 5 | 1 |
| <u>EcoRII</u> | high | 37 | | 'CC(^A _T)GG | >35 | 6 |
| <u>Fnu4HI</u> | low | 37 | | GC'NGC | >50 | 42 |
| <u>FnuDII</u> | low | 37 | | CG'CG | >50 | 23 |
| <u>HaeI</u> | low | | | (^A _T)GG'CC(^T _A) | - | 7 |
| <u>HaeII</u> | low | 37 | | PuGCGC'Py | >30 | 11 |
| <u>HaeIII</u> | low | 37 | | GG' [*] CC | >50 | 22 |
| <u>HgaI</u> | med | 37 | | GACGCNNNNN' CTGCGNNNNNNNNNN' | >50 | 11 |
| <u>HgiAI</u> | high | 37 | | G(^T _A)GC(^T _A)'C | 20 | 8 |
| <u>HhaI</u> | med | 37 | | GCG'C | >50 | 31 |
| <u>HincII</u> | med | 37 | | GTPy'PuAC | 34 | 2 |
| <u>HindII</u> | med | 37 | | GTPy'PuAC | 34 | 2 |

- 2) Inactivar el enzima por calentamiento de la muestra a 70°C durante 5-10 minutos.
- 3) Añadir 1/10 de volumen del tampón 10 veces concentrado , adecuado para el segundo enzima.
- 4) Adicionar un exceso de 2 veces el segundo enzima.
- 5) Incubar durante 2 horas a la temperatura adecuada.
- 6) Parar la reacción por simple congelación.
- 7) Comprobar la digestión del DNA por simple congelación.

ANOTACIONES:

-Cuando las dos dianas de restricción se hallan muy próximas, se recomienda realizar las dos digestiones una detrás de la otra, aunque la fuerza iónica sea la misma.

Si se utilizan enzimas de restricción en procesos que requieren su inactivación, se procede a su extracción con fenol-cloroformo, cloroformo. Después se precipita el DNA con etanol absoluto y el sedimento se disuelve en TE. Este tratamiento lleva a la eliminación de las endonucleasas de restricción presentes en el medio y por tanto favorece la acción de la DNA ligasa.

-Generalmente cuando la concentración de DNA a digerir era inferior a 1 microgramo, el volumen de reacción utilizado fué de 20 microlitros. Solo en el caso de digestiones encaminadas a purificar fragmentos determinados de DNA incluidos en plásmidos o en fragmentos mayores de DNA lineal (digestiones preparativas), la cantidad de DNA a digerir fué de 10-40 microgramos y el volumen de reacción de 50-100 microlitros.

2.7.1 CONSTRUCCION DE MAPAS DE RESTRICCION

La determinación de cada una de las "dianas" con secuencias reconocidas por los distintos enzimas de restricción, se llevó a cabo por digestión del DNA con ca-

da uno de los enzimas. En primer lugar el DNA se digirió con un único enzima de restricción y después se combinaron dos enzimas, determinandose el tamaño de los fragmentos generados, por electroforesis en geles de agarosa. Como marcadores de peso molecular se utilizaron el DNA del fago lambda digerido con EcoRI más HindIII y, PBR322 digerido con el enzima HinfI.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Digerir 2 microgramos de DNA con el enzima de restricción deseado, en un volumen final de 20 microlitros. Añadir el tampón de digestión correspondiente y un exceso de enzima (2 unidades por microgramo de DNA).
- 2) Incubar durante 2 horas a 37°C.
- 3) Analizar 1/10 de la mezcla de reacción (0,2 microgramos) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Utilizar como marcadores el DNA del fago lambda digerido con EcoRI más HindIII, separando los extremos Cos por calentamiento a 65°C durante 5 minutos. Guardar el resto de muestra a -20°C.
- 4) Si el DNA esta totalmente digerido, se procederá a medir la distancia a la que ha migrado cada fragmento desde el punto de aplicación de la muestra y calcular su peso molecular.
- 5) Tomar alícuotas de 0,2 microgramos de DNA ya digerido y tratarlas con los otros enzimas de restricción, seleccionados en cada caso. Es aconsejable escoger enzimas que corten pocas veces el DNA. Corregir la concentración del tampón cuando sea necesario.
- 6) Incubar 2 horas más a 37°C.
- 7) Analizar los fragmentos generados, por electroforesis en gel de agarosa al 1,5-2%. Incluir marcadores de peso molecular y muestras procedentes de la primera digestión.
- 8) Medir la distancia de migración o (desplazamiento) de cada fragmento con respecto al origen. Calcular su peso molecular.

ANOTACIONES:

-Cuando se digiere un DNA circular, los fragmentos generados han de ser iguales a los fragmentos obtenidos por acción del primer enzima más los fragmentos generados por acción del segundo. Si el número de fragmentos es menor que el esperado, comprobar la existencia de fragmentos muy pequeños o bandas dobles.

-Las longitudes de los diferentes fragmentos utilizados como marcadores de peso molecular son:

| <u>lambda EcoRI/HindIII (Kb)</u> | <u>pBR322 HinfI (Kb)</u> |
|----------------------------------|--------------------------|
| 21,24 | 1,631 |
| 5,14 | 0,517 |
| 4,97 | 0,506 |
| 4,28 | 0,396 |
| 3,54 | 0,344 |
| 2,02 | 0,298 |
| 1,91 | 0,221 |
| 1,59 | 0,220 |
| 1,37 | 0,154 |
| 0,95 | |
| 0,84 | |
| 0,56 | |
| 0,12 | |

2.8. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Se han descrito diversos métodos para la recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. Sin embargo, presentan dos problemas básicos. Primero, la extracción conjunta de posibles contaminantes de la agarosa que se comportan como inhibidores de enzimas a utilizar con posterioridad y segundo, el bajo rendimiento que resulta de este proceso, tanto más cuanto más largo es el fragmento de DNA a purificar.

2.8.1. EXTRACCION CON PAPEL DE DEAE-CELULOSA

En condiciones de baja fuerza iónica el DNA se une con gran afinidad a papel de DEAE-celulosa, pudiendo separarse con gran facilidad al aumentar la fuerza iónica. En esto se fundamenta el método descrito por Dretzen y col. (56) y que se ha utilizado en este trabajo, con pequeñas modificaciones.

Previamente a ser utilizado el papel de DEAE-celulosa (Whatman DE 81) fué sumergido durante varias horas en una solución 2,5 M ClNa. A continuación se lavó varias veces con agua estéril y se dejó secar a temperatura ambiente. De esta manera se extrajeron posibles impurezas presentes en el papel, que hubieran podido contaminar el DNA en el proceso de su elución.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Separar electroforéticamente el DNA en un gel de agarosa y visualizar los fragmentos generados con una lámpara UV a 360 nm.
- 2) Practicar una hendidura con un bisturí estéril justo por delante de la banda de DNA que nos interese recuperar.
- 3) Introducir un trozo de papel de DEAE-celulosa en di-

- cha hendidura, de la misma altura del gel después apretar ligeramente el gel desde ambos extremos.
- 4) Someter el gel, de nuevo, al proceso electroforético durante 15 minutos más.
 - 5) Comprobar que todo el DNA se haya unido al papel y extraer cuidadosamente el papel de DEAE-celulosa. Colocarlo en una jeringa de 1 ml y compactarlo al fondo con ayuda del émbolo.
 - 6) Sellar el extremo inferior de la jeringa con parafilm e introducir 100 μ l de TE pH 7,4 ,1 M ClNa.
 - 7) Sellar el otro extremo, introducirlo en un tubo de vidrio de 15 ml e incubar a 37°C durante 30 minutos.
 - 8) Sacar el parafilm de ambos extremos e introducir un tubo de microcentrífuga, desprovisto del tapón, en el fondo del tubo de vidrio de manera que la punta de la jeringa quede en el interior del tubo de microcentrífuga.
 - 9) Centrifugar durante 2 minutos a 1.000 x g y recuperar los 100 μ l del tubo de microcentrífuga.
 - 10) Repetir 3 veces desde el punto 6 al 9.
 - 11) Reunir los eluatos (400 μ l aproximadamente) y adicionar 400 μ l de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50: 48 :2)
 - 12) Agitar vigorosamente durante 1 minuto y centrifugar durante 5 minutos a 14.000 x g a temperatura ambiente para separar la fase orgánica de la acuosa.
 - 13) Transferir a otro tubo de microcentrífuga la fase acuosa y adicionar 400 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (96 : 4). Agitar fuertemente y centrifugar a 14.000 x g.
 - 14) Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C.
 - 15) Mezclar la solución y mantenerlo a -20°C, durante toda la noche , con objeto de precipitar el DNA.
 - 16) Centrifugar la muestra a 14.000 x g a 4°C durante 15 minutos.
 - 17) Eliminar el sobrenadante por aspiración. Lavar con

etanol al 70%.

18) Secar el sedimento a 37°C y resuspenderlo en TE pH 8,0.

ANOTACIONES:

En el caso de bandas de DNA muy proximas unas de otras en el gel y con objeto de evitar posibles contaminaciones, es conveniente colocar otro trozo de papel de DEAE- celulosa de forma semejante al descrito en el punto nº 2 y 3, pero esta vez por detrás de la banda del DNA (entre ésta y el polo negativo). De esta forma las posibles bandas de DNA contaminantes quedarían adheridas a dicho papel.

2.8.2. EXTRACCION EN FASE ORGANICA (CETAB)

El siguiente método, desarrollado por Langridge y col. (89) está basado en una interacción química entre el DNA y un catión amonio cuaternario (CETAB o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), los cuales forman un complejo en una solución acuosa de baja concentración salina. Este complejo puede ser transferido a una fase orgánica, separandolo así de la agarosa, y posteriormente vuelto a transferir a otra fase acuosa por un simple aumento de la concentración salina.

Dicho procedimiento requiere que tanto el DNA como la agarosa se encuentren en solución, lo cual se consigue utilizando la agarosa LMP o de bajo punto de fusión, que como se describió en el apartado (geles) funde a 65- 70°C y se mantiene licuada por encima de los 30°C.

PROCEDIMIENTO:

1) Separar los fragmentos de DNA mediante electrofore-

resis en agarosa de bajo punto de fusión.

- 2) Cortar el trozo de agarosa que contenga la banda de de interés y transferirla a un tubo.
- 3) Fundir a 65°C durante 30 minutos.
- 4) Añadir 1 volumen de solución de CETAB al 1% en butanol saturado con agua (butanol- CETAB) y 1 volumen de agua (ambas soluciones precalentadas a 37°C).
- 5) Agitar intensamente y centrifugar 1 minuto (14.000 x g) a 37°C.
- 6) Extraer la fase butanólica (fase superior) y al resto añadir de nuevo 1 volumen de la solución butanol-CETAB.
- 7) Agitar de nuevo y centrifugar 1 minuto a 37°C y 14.000 x g.
- 8) Extraer la fase superior (orgánica) y añadir al tubo anterior.
- 9) Añadir 0,25 volúmenes de ClNa 0,2 M, agitar fuertemente y centrifugar durante un minuto a 14.000 x g y a temperatura ambiente.
- 10) Recoger la fase acuosa (inferior) y repetir la extracción con 0,25 volúmenes de ClNa 0,2 M, reuniendo las dos fases acuosas recogidas.
- 11) Añadir 1 volumen de cloroformo enfriado en hielo, agitar y mantenerlo a 0°C durante 5 minutos.
- 12) Separar las fases por centrifugación a 14.000 x.g a 4°C durante 3 minutos.
- 13) Añadir 2 volúmenes de Etanol absoluto previamente enfriado y mantenerlo a -70°C durante una noche.
- 14) Centrifugar a 14000 x g a 4°C durante 15 minutos.
- 15) Lavar el sedimento con etanol al 70% (en agua). Centrifugar de nuevo durante 15 minutos a 14.000 x g.
- 16) Resuspender el sedimento con TE pH 8,0

ANOTACIONES:

En el primer proceso de extracción en el cual se a-

ñade butanol-CETAB y H_2O a la solución de agarosa, se crean dos fases , en la que el complejo CETAB-DNA se transfiere a la fase orgánica en virtud de la cadena hidrofóbica del catión. De esta manera, el DNA se puede separar de la agarosa, la cual permanece en la fase acuosa.

La extracción con cloroformo favorece la eliminación del CETAB presente en la muestra.

Finalmente, la cantidad y calidad del DNA recuperado ha de ser determinado mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.9. MARCAJE DE DNA POR "NICK TRANSLATION"

La detección de secuencias específicas de DNA, ya sea en genoma total o en moléculas recombinantes, es posible sólo si se dispone de una sonda apropiada y reconocible. Las técnicas usuales de marcaje de DNA utilizan nucleósidos trifosfatos marcados radioactivamente, especialmente con el isótopo ^{32}P , si bien en la actualidad se están desarrollando técnicas en las que se emplean precursores no radioactivos.

El marcaje por "nick translation" se basa en la sustitución de los nucleótidos de un segmento de DNA por nuevos nucleótidos presentes en la mezcla de reacción, uno o varios de los cuales están marcados con ^{32}P . Esto se consigue aprovechando las características de dos enzimas: la DNasa I y la DNA polimerasa I.

La DNasa I es una endonucleasa que genera incisiones al azar en el DNA, permitiendo que la DNA polimerasa I en virtud de su actividad exonucleasa $5' \longrightarrow 3'$ pueda separar nucleótidos de la cadena de DNA interrumpida a partir de la incisión. A continuación este mismo enzima añade los nucleótidos presentes en la mezcla de reacción a partir del extremo $3'\text{-OH}$ libre utilizando como molde la cadena complementaria (actividad polimerasa $5' \longrightarrow 3'$). A medida que se añaden nucleótidos al extremo $3'\text{-OH}$ la hendidura se va desplazando un lugar a lo largo de la cadena de DNA. De aquí el nombre de "nick translation".

El método seguido, es el descrito por Rigby (121). El volumen de reacción utilizado fué de 25 microlitros. La concentración de DNA marcada fué de 100 ng aproximadamente.

PROCEDIMIENTO:

Preparar la mezcla de reacción siguiente:

| | |
|--|--------------|
| DNA (100 ng) | 4,0 μ l |
| NTB x 10 | 2,5 μ l |
| 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP | 2,5 μ l |
| DNasa I (dilución 10^{-5} del stock de 1mg/ ml) | 1,0 μ l |
| DNA polI (Boehringer 7,5U/ μ l) | 1,5 μ l |
| 32 P(d-ATP) (50 μ Ci) | 4,0 μ l |
| H ₂ O c.s.p | 25 μ l |
| | 10,0 μ l |

Para ello se prosigue de la siguiente forma:

- 1) Poner la mezcla de reacción arriba citada, en un tubo de microcentrífuga e iniciar la reacción por adición en último termino de la DNA polimerasa I. Incubando 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2) Parar la reacción por adición de 170 μ l de TNE (10mM tris ClH pH 8, 10 mM, 100 mM NaCl, 1mM EDTA.
- 3) Adicionar 2 μ l de una solución saturada de Azul de bromofenol.
- 4) Calentar a 65°C durante 5 minutos para asegurar la parada de la reacción.
- 5) Adicionar 5 μ l de DNA de testiculos de salmón de una solución preparada a 100 mg/ml
- 6) Añadir lana de vidrio a la base de una jeringa y empaquetar con un lecho de sephadex G- 50 previamente equilibrado en TE (pH 8,0) conteniendo 0,1 M NaCl (STE)
- 7) Colocar un microtubo dentro de un tubo de corex y disponer la jeringa dentro del tubo de corex. Centrifugar a 1.600 x g durante 4 minutos en una centrifuga de sobremesa.
- 8) Añadir 200 μ l de STE y centrifugar en las mismas condiciones que en el paso 7.
- 9) Repetir el paso 8.
- 10) Cambiar el tubo de microcentrífuga que habiamos colocado en el interior del tubo corex por otro nuevo, colocar de nuevo la jeringa ya empaquetada y aplicar la muestra de DNA a la columna (200 μ l).

- 11)Centrifugar a 1.600 x g durante 4 minutos. Recoger el DNA marcado del interior del tubo de microcentrífuga
- 12)Desechar la columna, que retendrá los ^{32}P dNTPs.
- 13)Comprobar el ^{32}P incorporado al DNA, por contaje de 2 microlitros de la solución.

2.10 TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NITROCELULOSA

La transferencia de DNA a soportes de nitrocelulosa (Southern transfer) es una de las técnicas básicas de la Biología Molecular. Esta técnica posibilita que fragmentos de DNA, previamente separados según su tamaño, por electroforesis en gel de agarosa, pueden ser desnaturizados y posteriormente transferidos e inmovilizados en un filtro de nitrocelulosa. Así el DNA adherido al filtro puede ser hibridado con una sonda marcada radioactivamente, permitiendo así localizar las posiciones de las bandas complementarias a la sonda tras un proceso autorradiográfico.

El método utilizado es el descrito por Maniatis y col. (102).

PROCEDIMIENTO:

- 1) Separar electroforéticamente, los fragmentos de DNA en un gel de agarosa, en presencia de bromuro de etidio. Fotografiar el gel.
- 2) Irradiar el DNA durante 5 minutos, con luz UV de onda corta (254 nm) para fragmentar el DNA y facilitar su transferencia al filtro.
- 3) Incubar el gel en una solución desnaturizante (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente. Agitar suavemente durante el proceso.
- 4) Pasar el gel a una solución neutralizante (0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M ClNa) e incubar con suave agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Sobre una bandeja de tamaño adecuado verter 250-500 ml de SSC 10 veces concentrado. Colocar de forma transversal un soporte de vidrio. Poner tres tiras de papel 3 MM embebidas en SSC 10 veces concentrado, sobre el vidrio de manera que los extremos queden sumergidos en el mismo tampón.
- 6) Cortar un papel de nitrocelulosa (Schleicher&Schull

- BA 83) de la misma medida que el gel y embeberlo en 2 x SSC durante 5 minutos. Cortar tres papeles 3 MM de las mismas dimensiones del gel.
- 7) Colocar el gel sobre el papel Whatman 3 MM embebido en la solución de SSC 10 veces concentrada. Colocar tiras de parafilm alrededor del gel para evitar el contacto directo entre el puente de transferencia y los papeles de filtro que se colocarán más tarde.
 - 8) Poner el filtro de nitrocelulosa encima del gel evitando en lo posible la formación de burbujas de aire entre el gel y el filtro.
 - 9) Colocar encima del filtro de nitrocelulosa, uno de los tres papeles Whatman 3 MM previamente embebido en 2 x SSC.
 - 10) Añadir los dos restantes papeles Whatman 3 MM secos encima del anterior y a continuación poner un bloque de hojas de papel de filtro de 8-10 cm de altura. Colocar encima un vidrio y un peso aproximado de 0,5 Kg
 - 11) Cubrir todo el sistema con una película plástica autoadherente con objeto de impedir una excesiva evaporación.
 - 12) Dejar transferir el DNA durante 12-24 horas.
 - 13) Colocar el papel de nitrocelulosa entre hojas de papel de filtro y fijar el DNA por incubación del filtro de nitrocelulosa a 80°C durante 3-4 horas.
 - 14) Prehibridar e hibridar el filtro con la sonda de DNA marcada con ^{32}P según se describe en el apartado 2.11.
 - 15) Separar el gel y teñirlo durante media hora con una solución que contenga bromuro de etidio, para así evaluar la eficiencia del proceso de transferencia.

ANOTACIONES:

-La velocidad de transferencia del DNA depende de la longitud del fragmento de DNA y de la porosidad del gel. Los fragmentos de menos de una Kb se transfieren en pocas horas, mientras que para transferir fragmentos de DNA de más de 10 Kb son necesarias más de 12 horas.

- La unión del DNA al filtro de nitrocelulosa tiene lugar porque se establece un flujo de líquido desde la bandeja a través del gel y del papel de nitrocelulosa, hacia los papeles de filtro.

2.11. HIBRIDACION DNA-DNA SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA

Las hibridaciones se realizaron según los métodos descritos por Maniatis y col. (102) y Ricciardi y col. (119). La técnica se basa en la inmovilización del DNA sobre un soporte sólido, e hibridación del DNA fijado con una sonda de DNA.

La unión del DNA a los filtros de nitrocelulosa se hizo tal y como se describe en los apartados 2.10 y 2.13.

A continuación se procedió a la hibridación propiamente dicha, lo cual comprende tres pasos: prehibridación, hibridación y lavado del filtro.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Preparar 10- 20 ml. de solución de prehibridación que contenga doble concentración de Denhardt (2% Ficoll-tipo 400; 2% polivinilpirrolidona tipo 360; 2% BSA fracción V) 50 μg /ml de DNA de salmón (Sigma, tipo III) que debe ser previamente desnaturalizado a 100°C durante 10 minutos SSC x 6 (0,9 M NaCl, 0,09 citrato sodico).
- 2) Precalentar la solución, embeber los filtros en ella e incubar a 68°C sin agitación durante 2 h. en un recipiente cerrado para evitar la evaporación del líquido.
- 3) Preparar 10- 15 ml de solución de hibridación (es la misma solución de prehibridación a la que se habrá añadido 50 μg ./ml de DNA de salmón y una alicuota conveniente de sonda radioactiva previamente desnaturalizada a 100°C durante 10 minutos.
- 4) Precalentar dicha solución. Transpasar el filtro desde la solución de prehibridación a la de hibridación. Incubar a 68°C durante 12-20 horas.
- 5) Preparar la solución del primer lavado (6 x SSC) y precalentar a 65°C. Sumergir los filtros en ella inmediatamente después de la hibridación. Agitar durante 30 minutos a 65°C a fin de eliminar el DNA no unido.

- 6) Preparar la solución del segundo lavado (SSC; 0,1%SDS). Poner los filtros en ella e incubar 30 minutos a 45°C, en constante agitación.
- 7) Pasar los filtros a la tercera solución de lavado (SSCx 0,1; 0,1% SDS). Agitar 30 minutos a 45°C.
- 8) Secar los filtros sobre papel de celulosa a temperatura ambiente y proceder a exposición autorradiográfica.

ANOTACIONES:

- Debido a que la unión del DNA al filtro de nitrocelulosa no es una unión covalente, se van desprendiendo pequeñas cantidades del mismo durante los procesos de hibridación, deshibridación. Esto hace que los filtros solo se puedan reutilizar dos o tres veces.

- Las condiciones de hibridación no fueron ni demasiado restrictivas, ni excesivamente relajadas, debido a que no conocíamos la proporción de bases C+G. No fué posible determinar la temperatura de fusión de la sonda de DNA ya que viene condicionada por la composición de bases y por la concentración salina de la solución de hibridización.

- En todas las hibridaciones se añadieron $1-2 \times 10^6$ c.p.m/ ml de solución de hibridación.

2.12. CLONACION DE DNA GENOMICO EN EL BACTERIOFAGO

LAMBDA L47.1.

El bacteriófago lambda L47.1 se caracteriza por poseer DNA de 40,6 kb. Presenta ciertos pares de dianas de restricción que generan la formación de un fragmento central, no necesario para el crecimiento lítico del fago, y que puede ser sustituido por DNA foráneo. Así el tratamiento con el enzima Bam HI permite clonar fragmentos entre 4,7 y 19,6 kb, y con el enzima Eco RI fragmentos comprendidos entre 8,6 y 24,1 kb.

2.12.1. OBTENCION DE MOLECULAS RECOMBINANTES DE DNA FAGICO.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Digerir el DNA del vector con la endonucleasa de restricción deseada.
- 2) Separar los fragmentos generados por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.
- 3) Purificar los brazos del vector mediante utilización del método del CETAB descrito en el apartado 2.8.2.
- 4) Sembrar una alícuota de los brazos así obtenidos en un gel de agarosa al 0,7%. Comprobar que estén perfectamente purificados.
- 5) Digerir el DNA genómico con la misma endonucleasa de restricción que el vector.
- 6) Mezclar una alícuota del vector linearizado con una alícuota del DNA genómico digerido y proceder a la ligación del mismo tal y como se describe en el apartado 2.14. (puntos 5-10).
- 7) 10 μ l de la mezcla de ligación se empaquetaran "in vitro" mediante la utilización de extractos de empaquetamiento obtenidos según se describe a continuación.

ANOTACIONES:

-Con partículas fágicas obtenidas se infectaron diversas cepas dependiendo de la selección fenotípica que se quisiera realizar. Se sembró por placa una alícuota de cultivo que generase 1000-3000 clones por placa. Seguidamente los clones así obtenidos se utilizaron en experimentos de hibridación.

2.12.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE EMPAQUETAMIENTO.

Becker y Gold en 1975 (31) fueron los primeros en desarrollar un método que permitía el empaquetamiento "in vitro" del DNA del fago lambda. Para ello utilizaron mezclas de extractos de empaquetamiento preparados a partir de bacterias infectadas con mutantes del bacteriófago lambda, cuya mutación impedía la expresión de los genes necesarios para el ensamblaje de las partículas fágicas (genes A, E, D).

Los profagos defectivos en el gen E se caracterizan por acumular en el citoplasma de la bacteria todos los componentes de la capsida viral, y los defectivos en el gen D o en el gen A sintetizan precabezas inmaduras y vacías. Además los lisógenos contienen las siguientes mutaciones: una mutación termosensible en el gen CI (CI_{ts} 857) que permite la inducción del profago a 42°C por inactivación de una proteína represora. Una mutación en el gen S que evite la lisis de la célula y por tanto favorezca la acumulación dentro del citoplasma de la célula de los componentes de la capsida del fago. Una delección en la región b que impide el empaquetamiento de moléculas de DNA de lambda endógenos en extractos obtenidos de células inducidas. Una mutación red S (en el fago lambda) y recA (en E.coli) que impide la recombinación entre el DNA de lambda endógeno en los extractos y el añadido de forma exógena.

Los extractos de empaquetamiento se preparan después del crecimiento de las cepas lisogénicas a 30-32°C hasta mitad de la fase exponencial. Inducción del profago por inactivación del represor CI a 45°C e incubación a 37°C durante 2 o 3 horas para favorecer la acumulación de los productos o proteínas necesarias para el empaquetamiento "in vitro" de la partículas fágicas.

Actualmente existen varios métodos para la preparación de extractos de empaquetamiento (141,145) que permiten la obtención de partículas fágicas viables con una alta eficiencia. La metodología seguida en nuestro caso fué la descrita por Scalenghe y col.(141).

2.12.2.1. EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE LA CEPA BHB2690, POR EFECTO DE ULTRASONIDOS

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 100 ml de LB con una colonia de la cepa BHB2690 (Dam) e incubar a 37°C durante una noche.
- 2) Inocular un matraz erlenmeyer conteniendo 500 ml de LB precalentado a 32°C con una alícuota del precultivo a fin de obtener una densidad inicial de células de 0,1 medida a 600 nm. Incubar a 32°C hasta obtener una absorbancia de 0,6 a 600 nm.
- 3) Inducir la fase lítica del profago por incubación del cultivo a 45°C durante 15 minutos.
- 4) Incubar las células inducidas a 37°C durante 2 horas en agitación. Separar una alícuota del cultivo y adicionar una gota de cloroformo para comprobar la correcta inducción del profago por aclaramiento del cultivo.
- 5) Recoger las células por centrifugación a 4000 x g. durante 10 minutos a 4°C.
- 6) Resuspender el sedimento celular en 3,6 ml de tampón recién preparado (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol)

- 7) Lisar las células de la suspensión por el efecto de ultrasonidos durante varios periodos de 10 segundos. Mantener la temperatura a 4°C por inmersión en un baño de agua y hielo del tubo que contiene la suspensión celular. Enfriar la muestra durante 20-30 segundos entre cada periodo de sonicación. Mantener la suspensión al efecto de los ultrasonidos hasta que la solución se aclare y la viscosidad disminuya.
- 8) Centrifugar la muestra sonicada a 12.000 x g. durante 10 minutos a 4°C. Recoger el sobrenadante y medir su volumen.
- 9) Añadir un volumen del tampón utilizado en el punto 6 y 0,16 volúmenes de tampón de empaquetamiento recién preparado (6mM Tris-HCl pH 8,0 + 50 mM espermidina + 50 mM putrescina + 20 mM Mg Cl₂ + 30 mM ATP + 30 mM 2-mercaptoetanol). Repartir alícuotas de 15 µl en tubos de microcentrífuga preenfriados a 4°C. Congelar la muestra por inmersión del tubo en nitrógeno líquido y guardarla a -70°C hasta su uso.

2.12.2.2. EXTRACTO OBTENIDO A PARTIR DE LA CEPA BHB2688, POR CONGELACION-DESCONGELACION.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 100 ml de LB con una colonia de la cepa BHB-2688 (Eam) e incubar a 37°C durante una noche.
- 2) Transferir una alícuota del precultivo a un matraz erlenmeyer que contenga 500 ml de LB precalentado a 32°C a fin de obtener una densidad inicial de células de 0,1 medida a 600 nm. Incubar a 32°C hasta alcanzar una absorbancia de 0,6 a 600 nm.
- 3) Incubar el cultivo a 45°C durante 15 minutos para inducir la fase lítica del profago.
- 4) Incubar las células inducidas a 38°C durante 2-3 horas en agitación. Separar una alícuota del cultivo y adicio-

nar una gota de cloroformo y comprobar la correcta inducción del profago por aclaramiento del cultivo.

5) Recoger las células por centrifugación a $4.000 \times g$. durante 10 minutos a $4^{\circ}C$.

6) Resuspender el sedimento celular en una solución de sacarosa (10% sacarosa en 50 mM Tris-HCl pH 8,0), previamente enfriada a $4^{\circ}C$. Repartir, en microtubos preenfriados a $4^{\circ}C$, alícuotas de 0,5 ml de la suspensión celular. Añadir a cada tubo $25 \mu l$ de una solución de lisozima fría (2 mg/ml de lisozima en 0,25 M Tris-HCl pH 8,0). Cerrar el tubo y sumergirlo en nitrógeno líquido.

7) Descongelar los extractos en hielo y adicionar a cada tubo $25 \mu l$ de tampón de empaquetamiento (su composición se detalla en el apartado anterior, punto 9) y mezclar.

8) Centrifugar los extractos a $48.000 \times g$. durante 1 hora a $4^{\circ}C$. Recoger el sobrenadante.

9) Repartir el sobrenadante en alícuotas de $10 \mu l$ en microtubos preenfriados a $4^{\circ}C$. Tapar los tubos y sumergirlos en nitrógeno líquido hasta su congelación. Guardar los tubos a $-70^{\circ}C$ hasta su utilización.

2.12.3 EMPAQUETAMIENTO "IN VITRO" DEL DNA FAGICO.

PROCEDIMIENTO:

1) El lisado obtenido por el procedimiento de congelación-descongelación es el que se descongela en primer lugar. Transferir el lisado de la cepa BHB2688 (Eam) previamente descongelado al tubo que contiene el lisado de la cepa BHB2690 (Dam) todavía congelado.

2) Mezclar suavemente. Cuando los dos extractos se han descongelado, se adiciona $10 \mu l$ de DNA a empaquetar. Mezclar con ayuda de una varilla capilar e incubar 1 hora a $37^{\circ}C$.

3) Adicionar 0,5-1 ml de medio mineral (SM) y dos gotas de cloroformo. Separar los restos celulares por centrifugación

a 15.000 × g durante 1 minuto.

ANOTACIONES:

Estos extractos presentan un alto grado de selectividad en el tamaño del DNA que es empaquetado (141). DNAs recombinantes que tienen una longitud del 80-90% del genoma del bacteriófago lambda tipo salvaje se empaquetan con una eficiencia 20-50 veces menor respectivamente que el DNA de lambda tipo salvaje.

2.13. IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE CLONES RECOMBINANTES.

Para la identificación de los clones recombinantes se utilizó el método seguido por Benton y Davis (16), que consiste en técnicas de hibridación in situ.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Mezclar 2×10^8 células con 10^6 bacteriófagos recombinantes. Incubar a 37°C durante 15 minutos, para que se produzca la infección.
- 2) Adicionar, a una alícuota de la mezcla, 3 ml de agar blando (7 g de agarosa en 100 ml de LB) precalentado a 48°C .
- 3) Verter sobre una placa de LB. Incubar a 37°C durante 8-12 horas.
- 4) Observar las calvas de lisis y colocar las placas en nevera durante 2 horas, para que el agar se endurezca.
- 5) Colocar encima de cada placa un filtro de nitrocelulosa y marcar su orientación.
- 6) Sumergir el filtro en una solución desnaturalizante que contenga 0,1 N NaOH; 0,15 M ClNa e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- 7) Secar el filtro sobre un papel Whatman nº 3 . Sumergirlo seguidamente en una solución neutralizante (0,5 M Tris-ClH pH 7,5, 1,5 M ClNa) durante 1 minuto.
- 8) Lavar el filtro en una solución SSPE x 2.
- 9) Colocar el filtro de nitrocelulosa dentro de papel de celulosa. Secar a 80°C durante 2 horas.
- 10) Hibridar el filtro con una sonda radioactiva, según el protocolo descrito en el apartado 2.11.
- 11) Fijar el filtro en un soporte de cartón y cubrir el sistema con una película plástica autoadherente. Ponerlo en contacto con una película de rayos-X para así obtener la imagen autorradiográfica.

- 12) Localizar, los clones positivos, en las placas de LB por comparación con las señales positivas obtenidas en la autorradiografía.
- 13) Aislar los clones mediante la utilización de pipetas pasteurs estériles y colocarlo en un tubo de microcentrífuga. Añadir 0,5-1 ml de SM , dos gotas de cloroformo y mantenerlo a 4°C durante 2-3 horas para que los fagos puedan difundir del agar.
- 14) Amplificar el número de fagos a partir de un único clon. Extraer su DNA y someterlo al tratamiento con endonucleasas de restricción. Comprobar si el clon seleccionado es correcto.

ANOTACIONES:

-Antes de proceder a la replica en papel de nitrocelulosa es necesario enfriar las placas a 4°C , para evitar que el agar se adhiera al papel.

2.14. CLONACION DE DNA GENOMICO EN PLASMIDOS.

El fragmento de DNA genómico clonado en el bacteriófago lambda L47.1 , puede ser subclonado en plásmidos.

La clonación en plásmidos facilita el estudio del fragmento genómico mediante la utilización de endonucleasa de restricción.

La mayor dificultad del clonaje en plásmidos es el poder distinguir entre los clones recombinantes y el vector recircularizado, si bien dependiendo del vector utilizado se pueden abordar diferentes estrategias.

En los procesos de Subclonaje se utilizaron los siguientes plásmidos: pBR322, pUC18 y Bluescript.

El pBR322 es un plásmido de 4,3 Kb, que contiene dos genes que codifican para la resistencia a tetraciclina y ampicilina. Cuando E.coli es transformada con dicho plásmido, es capaz de crecer en presencia de ambos antibióticos, si por el contrario se inserta un fragmento de DNA genómico en una secuencia de restricción que evite la expresión de la resistencia a uno de los dos antibióticos, la bacteria solo es capaz de crecer en presencia del otro antibiótico.(102)

El pUC18 es un plásmido de 2,7 Kb que conserva muchas de las características del plásmido pBR322 y del M13, así conserva el gen del pBR322, que expresa la resistencia a ampicilina, el origen de replicación y una porción del gen lacZ de E.coli. En el interior de la región lac se encuentra una secuencia que reconoce gran número de dianas de restricción únicas. Cuando un fragmento es clonado en esta región del plásmido, el gen lac es inactivado. Las cepas de E.coli Lac⁻ (JM103, JM109) transformadas con los plásmidos recombinantes, al crecer en placas que contengan X-gal y IPTG producen colonias blancas, debido a la falta de expresión del gen lac . Las mismas células transformadas con el plásmido pUC18 y crecidas en las mismas condiciones producen colonias azules.

Bluescript, es un plásmido de 3,0 Kb que contiene 26 dianas de restricción únicas colocadas en un "polilinker". Flanqueando dichas secuencias se encuentran los promotores de la RNA polimerasa de los fagos T3 y T7 y que permite la síntesis in vitro de RNA.

El "polilinker" y ambos promotores de la RNA polimerasa se encuentran situados en un fragmento que contiene la porción N-terminal del gen lacZ. Así, al igual que sucede con el plásmido pUC18, cuando una cepa Lac^- se transforma con dicho plásmido y se siembra en placas de LB conteniendo X-gal e IPTG forma colonias azules, mientras que los plásmidos recombinantes producen colonias blancas.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Digerir 1 microgramo de DNA del fago recombinante con la endonucleasa de restricción deseada.
- 2) Preparar la muestra según se detalla en el apartado 2.17. y sembrarla en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.
- 3) Purificar el fragmento a subclonar, según el método del CETAB (apartado 2.9.2)
- 4) Digerir 0,2-0,5 microgramos del vector con la misma endonucleasa de restricción utilizada para la digestión del DNA del fago recombinante.
- 5) Mezclar una parte del DNA del plásmido linearizado con un exceso (2 partes) del fragmento a subclonar.
- 6) Añadir 1 microlitro del tampón de ligación 10 veces concentrado (1 M ClNa; 0,1 M Tris-ClH pH 7,8; 1 mM EDTA) y la cantidad suficiente de agua para 10 microlitros.
- 7) Calentar 10 minutos a 70°C y enfriar de forma gradual hasta 0°C. Mantener a 0°C durante 30 minutos.
- 8) Añadir 10 microlitros de una solución fría que contenga 1 microlitro del tampón de ligación x 10, (20 mM DTT y 2 mM ATP).
- 9) Mezclar bien y adicionar 1 microlitro de DNA ligasa de

T4 (1 unidad/microlitro) de Boehringer.

10) Incubar a 14°C durante una noche.

11) Transformar la cepa deseada con el DNA procedente de la ligación y seleccionar los clones, por la perdida de resistencia a un antibiótico (pBR322) o por la perdida de complementación del genotipo gal (pUC18).

ANOTACIONES:

-El X-gal se prepara a una concentración de 20 mg/ml en dimetilformamida y el IPTG a 23,2 mg/ml en agua adicionando 50 y 10 microlitros respectivamente por cada 30 ml de medio LB.

-Las cepas utilizadas en los procesos de transformación con el plásmido pUC18, son cepas en las que se han deleccionado los genes lac y pro del cromosoma, si bien estos dos genes se encuentran presentes en el episoma F de la bacteria. Por otra parte al gen lac del episoma se le ha deleccionado la región que codifica el fragmento alfa (amino terminal), sintetizando solo el fragmento carboxi terminal de la proteína.

-El plásmido pUC18 que codifica la región amino terminal de la β -galactosidasa (fragmento) es capaz de complementar el gen defectivo de la β -galactosidasa presente en el episoma F de la célula huésped. Esta complementación produce una β -galactosidasa activa y por tanto la obtención de colonias azules cuando crecen en presencia de X-gal. e IPTG, sin embargo, la perdida del factor F por parte de la célula conduce siempre a la obtención de transformantes blancos, que interfieren en la selección de transformantes que hayan incorporado moléculas plásmidicas recombinantes incapaces también de producir β -galactosidasa activa por interrupción del fragmento del gen lacZ del plásmido por la inserción del DNA genómico.

2.15. TRANSFORMACION DE E.COLI CON DNA PLASMIDICO.

E.coli requiere, para el proceso denominado transformación, de un tratamiento previo con Cl_2Ca . Las células se hacen así "competentes" para la incorporación de DNA plásmidico. El Cl_2Ca debe actuar alterando la pared celular, permitiendo así la entrada del DNA dentro de la bacteria. (101).

El DNA plásmidico lleva genes marcadores que codifican la resistencia a antibióticos. En el interior de la célula el DNA plásmidico se replica independientemente del cromosoma bacteriano expresando así los genes que codifican la resistencia a antibióticos. Así se puede seleccionar las células transformadas por su resistencia a un antibiótico.

Los plásmidos utilizados por nosotros son el pUC18 y Bluescript que codifican la resistencia a ampicilina, la inserción de DNA en el "polilinker" de estos plásmidos no afecta la expresión de este gen, por lo que los transformantes se seleccionarán en medios que contengan ampicilina (100 microgramos/microlitro).

El plásmido pBR322 codifica la resistencia a ampicilina y tetraciclina. Así la inserción del DNA dentro del vector, interrumpe la expresión de uno de los dos genes. En nuestro caso, el fragmento clonado interrumpía el gen que codifica para la tetraciclina, por lo que los transformantes solo podían ser seleccionados por su resistencia a ampicilina.

2.15.1. PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES.

La obtención de células competentes se realizó principalmente mediante la utilización de dos métodos, el del Cl_2Ca (51) y otro que combina la acción del Cl_2Ca y otras sales, denominado método del $Cl_2Ca/ClRb$ (72,73) Siempre que el DNA era circular, se utilizaba el método del Cl_2Ca

por ser más rápido, sin embargo es menos eficiente. Cuando el DNA a transformar era el producto de una reacción de ligación, se utilizó el segundo método, que pese a ser mucho más laboriosa, es 100 veces más eficiente en cuanto al número de transformantes obtenidos por microgramo de DNA.

2.15.1.1. METODO DEL Cl_2Ca

El protocolo seguido es el descrito por Dagert y Erlich (51).

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 5 ml de LB con una colonia de la cepa que queramos transformar. Incubar durante una noche a 37°C.
- 2) Inocular 50 ml de LB (en un erlenmeyer de 500 ml) con 0,2 ml del precultivo. Crecer las células a 37°C con fuerte agitación durante 2-3 horas, hasta alcanzar una absorbancia de 0,2-0,3 (a 550 nm)
- 3) Colocar el cultivo en hielo, durante 10 minutos y centrifugar 40 ml de la suspensión celular durante 10 minutos a 5.000 r.p.m (Tubos Corex de 30 ml estériles, rotor SS-34 Beckman) a 4°C.
- 4) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 20 ml de una solución estéril de Cl_2Ca 0,1 M previamente enfriada a 4°C e incubar a 0°C durante 20-25 minutos.
- 5) Centrifugar a 5.000 r.p.m (rotor Beckman SS-34) durante 10 minutos a 4 °C
- 6) Verter el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 0,5 ml de una solución 0,1 M de Cl_2Ca fría (4°C) .Mantener en hielo un mínimo de 2 horas y un máximo de 24 horas antes de su utilización.

ANOTACIONES:

-Durante el proceso de obtención de células competentes

no se debe someter a las células a agitaciones violentas porque disminuyen considerablemente la eficiencia de transformación.

-Las células competentes, se pueden utilizar durante 48 horas después de haberlas obtenido. La eficiencia de transformación aumenta de 4 a 6 veces durante las 12 primeras horas y empieza a disminuir transcurridas las 24 horas.

-La eficiencia de transformación oscila entre 10^4 a 10^6 colonias/microgramo de DNA, dependiendo de la cepa utilizada.

-Hemos dicho que las células debían recogerse a una absorbancia de 0,2 (550 nm), ahora bien cabe especificar que esta absorbancia corresponde a 10^8 células/ml cuando la cepa es recA⁺. Si la célula es recA⁻ deben ser recogidas a una absorbancia de 0,6 que corresponde también a 10^8 células/ml.

2.15.1.2. METODO DEL ClRb/Cl₂Ca.

Este método ha sido el de elección cuando se ha procedido a subclonar algún fragmento de DNA genómico, en plásmidos.

El protocolo seguido es el descrito por Hanahan (72,73).

Las células se hicieron crecer en presencia de Mg²⁺, siendo más tarde tratadas con Mn²⁺, Ca²⁺, K⁺, DMSO, DTT.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Sembrar por estría una placa de LB que contenga 10 mM SO₄Mg y 10 mM Cl₂Mg con una colonia de la cepa a transformar.
- 2) Inocular 50 ml de LB + 10 mM SO₄Mg + 10 mM Cl₂Mg con 4-5 colonias del precultivo obtenido en placa. Incubar a 37°C con fuerte agitación hasta una absorbancia de 0,6 medida a 600 nm (3-4 horas).
- 3) Mantener el cultivo en hielo durante 10-15 minutos. Centrifugar 40 ml de la suspensión de células, en un tubo de polipropileno estéril, durante 10 minutos a 5.000 r.p.m

(rotor Sorval SS-34) a 4°C.

- 4) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 13 ml de tampón TFB (10 mM MES-K pH 6,2, 100 mM ClRb, 45 mM Cl₂Mn, 10 mM Cl₂Ca) con ayuda de una pipeta de 10 ml. No agitar fuertemente.
- 5) Mantener las células en hielo durante 10-15 minutos. Centrifugar a 5.000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C.
- 7) Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 3,2 ml del tampón TFB, previamente esterilizado por filtración.
- 8) Adicionar 112 microlitros de una solución de DMSO/DTT (1 M DTT + 10 mM acetato pótasico + 90% (V/V) DMSO). Mantener 10 minutos en hielo.
- 9) Adicionar 112 microlitros más de la solución de DMSO/DTT .Mantener 10 minutos en hielo como mínimo. Utilizar las células el mismo día de su obtención.

PROCEDIMIENTO:

-La eficiencia de transformación obtenida es del orden de 10^6 - 10^7 transformantes/microgramo de DNA.

-La adición de la solución de DMSO/DTT en dos veces aumenta considerablemente la eficiencia de transformación.

2.15.2 TRANSFORMACION

El proceso de transformación implica la entrada de DNA al interior de las células previamente tratadas para, que se hagan competentes, según los métodos detallados en el apartado 2.15.1.1 y 2.15.1.2.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Poner en un tubo de microcentrífuga 10 microlitros de la solución que contiene el DNA a transformar y 200 microlitros de las células competentes. Mantener en hielo duran-

te 30 minutos.

- 2) Someter la mezcla a un choque térmico por incubación a 37°C durante 5 minutos.
- 3) Adicionar 800 microlitros de LB e incubar 1 hora a 37°C (si la selección es por resistencia a ampicilina) o $\frac{1}{2}$ hora (selección por resistencia a tetraciclina).
- 4) Sembrar 200 microlitros de la suspensión por placa en placas de LB-ampicilina. Repartir bien las células con ayuda de una asa de vidrio.
- 5) Incubar las placas a 37°C durante 12-16 horas.

ANOTACIONES:

-Paralelamente al proceso de transformación del DNA deseado se debe preparar un tubo que contenga 10 ng de pUC18 pBR322 u otro plásmido superenrollado, para así determinar la eficiencia de transformación y otro, que contenga únicamente las células competentes (control de que no existe ninguna bacteria contaminante)

-Las placas que contienen ampicilina no deben incubarse más de 24 horas a 37°C. La β -lactamasa excretada al medio por las células transformadas resistentes a la ampicilina difunde rápidamente y destruye el antibiótico del medio, permitiendo el crecimiento de colonias denominadas satélites, sensibles a la ampicilina.

2.16. PREPARACION DE DNA PLASMIDICO.

Se han descrito diferentes métodos para la preparación de DNA plásmidico, basados todos ellos en que el DNA de E.coli es de mayor tamaño que el plasmídico y que además se obtiene en forma de moléculas lineales, rotas. El DNA plasmídico se obtiene en forma circular, covalentemente unido.

Así la preparación del plásmido presupone el crecimiento de la cepa portadora del plásmido, amplificación del mismo, sedimentación y lisis de la bacteria y por último purificación del DNA plasmídico en gradiente de cloruro de cesio.

Una de las diferencias fundamentales entre el DNA de E.coli y el del plásmido es que este último no precisa de síntesis de proteínas, por lo que puede ser amplificado de forma selectiva añadiendo un inhibidor de la síntesis proteica, generalmente cloranfenicol, al cultivo bacteriano. (43).

2.16.1. OBTENCION DE PLASMIDO A GRAN ESCALA.

La obtención de DNA plasmídico se basa en la desnaturalización selectiva, por álcali o calor, del DNA cromosómico, en condiciones en que el DNA plasmídico, covalentemente cerrado, permanece íntacto. (19 , 80) . Al neutralizar o enfriar el DNA cromosómico forma un precipitado insoluble que puede ser separado junto con proteínas y restos de bacterias. Las moléculas circulares del plásmido permanecen en el sobrenadante.

La lisis de las bacterias, en nuestro caso, se realizó por tratamiento con alcalí, según el método descrito por Birnboim y Doly (19).

PROCEDIMIENTO:

1) Inocular 10 ml del medio LB, suplementado con ampici-

lina (100 $\mu\text{g/ml}$), a partir de una colonia. Incubar a 37°C durante 12-16 horas, con fuerte agitación.

2) Inocular 500 ml de LB-amp (en un matraz erlenmeyer de 2 litros) con 5 ml del precultivo.

3) Incubar a 37°C con fuerte agitación, hasta alcanzar una absorbancia de 0,8-1 a 600 nm.

4) Adicionar 2,5 ml de una solución de cloranfenicol (34 mg/ml en etanol absoluto). Incubar a 37°C con vigorosa agitación durante 12-16 horas.

5) Sedimentar las células por centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante.

6) Resuspender el sedimento celular con 10 ml de una solución de lisis (50 mM glucosa + 25 mM Tris-ClH pH 8,0 + 10 mM EDTA) que contenga lisozima a una concentración de 5mg. por ml. Dejar actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

7) Adicionar 20 ml de una solución de 1% SDS; 0,2 N NaOH; recién preparada. Mezclar por inversión. Dejar actuar 10 minutos a 4°C.

8) Añadir 15 ml de una solución 3 M acetato potásico pH 4,8, previamente enfriada en hielo. Mezclar por inversión y dejar en hielo durante 20 minutos.

9) Centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se observará un precipitado blanco en el fondo del tubo debido al DNA genómico de E.coli y restos celulares.

10) Recoger el sobrenadante y transferir cantidades equivalentes (18 ml aproximadamente) a tubos corex de 30 ml.

11) Adicionar a cada tubo 0,6 volúmenes (12 ml) de alcohol isopropílico. Mezclar bien y Dejar 15 minutos a temperatura ambiente.

12) Centrifugar a 12.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Si la centrifugación se realiza a 4°C precipitan sales.

13) Eliminar el sobrenadante por aspiración y lavar el sedimento con etanol del 70%. Secar a 37°C durante 15-30 minutos.

- 14) Disolver el sedimento en 7,0 ml de TE pH 8,0, que contenga RNasa A a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Digerir el RNA por incubación a 37°C durante 30 minutos.
- 15) Purificar el plásmido por centrifugación en gradiente de densidad en cloruro de cesio y en presencia de Bromuro de etidio. Para ello, medir el volumen de la solución de DNA y adicionar 1 gramo de cloruro de cesio por cada mililitro de solución. Mezclar bien hasta la total disolución del cloruro de cesio.
- 16) Adicionar 0,8 ml de una solución de Bromuro de etidio (10 mg/ml en agua) por cada 10 ml de la solución de cloruro de cesio. Comprobar la densidad final de la solución que ha de ser de 1,55 g/ml. La concentración final de Bromuro de etidio debe ser aproximadamente de 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 17) Transferir la solución de cloruro de cesio a un tubo de policarbonato de 10 ml. Equilibrar este tubo con otro al que se habrá añadido una solución de cloruro de cesio a una concentración de 1 g/ml en agua.
- 18) Centrifugar a 45.000 r.p.m durante 48 horas a 20°C en un rotor Beckman Ti-65.
- 19) Fijar el tubo en una pinza y visualizar el DNA con ayuda de una lámpara de luz UV de onda larga. Se observarán dos bandas de DNA. La banda superior formada por DNA genómico y DNA plasmídico lineal y la banda inferior corresponde al DNA plasmídico circular.
- 20) Extraer la banda de DNA plasmídico circular por aspiración.
- 21) Continuar el procedimiento de extracción del Bromuro de etidio de la solución, precipitación del DNA y disolución del mismo según la metodología descrita en el apartado 2.5.2 desde el punto 8 al 15.

ANOTACIONES:

-El precipitado rojo que se forma al añadir la solución de Bromuro de etidio a la solución de DNA y cloruro de cesio, es debido a la formación de complejos entre el Bromu-

ro de etidio y las proteínas bacterianas.

-Con este método es posible obtener aproximadamente entre 0,5-1 ng de plásmido a partir de 500 ml de cultivo.

2.16.2.OBTENCION DE PLASMIDO A PEQUEÑA ESCALA.

La obtención de plásmido pequeña escala se utiliza sobre todo cuando se desea proceder a la identificación de clones recombinantes. Permite analizar gran número de plásmidos en un corto espacio de tiempo, si bien uno de los mayores inconvenientes es la presencia de cantidades más o menos apreciables de sales que pueden inhibir la actividad de los enzimas de restricción.(80).

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 5 ml de medio LB-amp con una colonia de la cepa portadora del plásmido. Incubar a 37°C durante 12-16 horas, con fuerte agitación.
- 2) Transferir el cultivo a un tubo corex de 15 ml y centrifugar a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C.
- 3) Aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular con 200 μ l de una solución de lisis (50 mM glucosa + 25 mM Tris-ClH pH 8,0 + 10 mM EDTA) que contenga lisozima a una concentración de 5 mg/ml. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Adicionar 400 μ l de una solución 1% SDS + NaOH recién preparada. Mezclar por inversión y dejar el tubo en hielo 10 minutos.
- 5) Añadir 300 μ l de una solución fría de acetato potásico 3 M pH 4,8.
- 6) Centrifugar 10 minutos a 15.000 x g , a 4°C. Aspirar el sobrenadante y repartirlo en dos tubos de microcentrífuga
- 7) Adicionar un volumen igual de fenol/cloroformo. Mezclar bien y centrifugar a 15.000 x g durante 2 minutos. Transferir el sobrenadante a otro tubo.

- 8) Medir el volumen del sobrenadante y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 9) Centrifugar 10 minutos a 15.000 x g. Aspirar el sobrenadante y lavar el sedimento con etanol del 70%. Agitar y volver a centrifugar.
- 10) Aspirar el sobrenadante y secar el sedimento a 37°C.
- 11) Disolver el sedimento en 50 μ l de TE conteniendo RNasa (20 μ g/ml). Incubar a 37°C durante 30 minutos.

ANOTACIONES:

-El rendimiento obtenido por este método es de 1-3 μ g de DNA por cada 5 ml de cultivo, suficiente para poder proceder al análisis del plásmido.

- Las preparaciones de DNA obtenidas según este método se pueden digerir con la mayoría de enzimas de restricción. Se aconseja digerir el DNA en un volumen grande de reacción para así diluir los posibles inhibidores de la actividad de los enzimas de restricción y con un exceso de enzima de 10 veces.

-Si existen problemas en la digestión del DNA, es conveniente proceder de nuevo a una extracción con fenol/cloroformo, repitiendo en este caso desde el punto 8 al 13.

2.17. TECNICAS ELECTROFORETICAS.

2.17.1. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Las técnicas electroforéticas se utilizan con frecuencia en la separación e identificación de fragmentos de DNA y RNA, así como en el aislamiento de fragmentos concretos de DNA (electroforesis preparativa).

La migración electroforética del DNA a través de geles de agarosa se realizó teniendo en cuenta su peso molecular, concentración de agarosa, conformación del DNA y corriente aplicada. Así las moléculas de DNA lineal de doble cadena migran de forma inversamente proporcional al \log_{10} de su peso molecular (75). Ello permite la determinación del tamaño de un fragmento de DNA concreto, mediante el uso de marcadores de peso molecular conocido.

Las concentraciones de agarosa utilizadas oscilaron entre el 0,8-1,5% P/V. Existe una relación lineal entre el logaritmo en base 10 de la movilidad electroforética del DNA y la concentración de agarosa en el gel. A continuación se detalla una relación de la concentración de agarosa a utilizar en el gel con respecto al tamaño de los fragmentos de DNA que se quiera separar.

| <u>CONCENTRACION DE AGAROSA EN EL GEL (%)</u> | <u>INTERVALO DE SEPARACION DE FRAGMENTOS (Kb)</u> |
|---|---|
| 0,3 | 60-5 |
| 0,6 | 20-1 |
| 0,7 | 10-0,8 |
| 0,9 | 7-0,5 |
| 1,2 | 6-0,4 |
| 1,5 | 4-0,2 |
| 2,0 | 3-0,1 |

Según su información, DNAs de idéntico peso molecular migran de forma diferente a través de geles de agarosa. En las condiciones utilizadas por nosotros, migra más el

el DNA circular superenrollado que el DNA lineal.

El voltaje aplicado fué de 5 V/cm, parece ser además que es el óptimo para obtener una máxima resolución. A bajo voltaje la tasa de migración de fragmentos de DNA lineal es proporcional al voltaje aplicado.

En todos los casos la electroforesis se realizó en presencia de Bromuro de etidio, visualizandose el DNA en un transiluminador de luz U.V de onda media 302.

Se utilizó geles de agarosa horizontales. Las cubetas utilizadas eran de 10,2 x 6,5 cm. (Minigel, BioRad) con un volumen de 30 ml.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Añadir una cantidad necesaria de agarosa en polvo (de media electroendosmosis, Sigma) en el volumen adecuado de tampón de electroforesis TAE (40 mM Tris- acetato, 1mM EDTA pH 8,0).
- 2) Calentar en un horno microondas hasta disolución total (2-3 minutos).
- 3) Atemperar la disolución a 50°C y añadir Bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 4) Sellar el molde del gel con cinta adhesiva. Colocar el peine a la distancia adecuada y verter la solución de agarosa- Bromuro de etidio.
- 5) Al cabo de 1 hora (tiempo necesario para que el gel solidifique) sacar el peine y colocar el gel en la cubeta de electroforesis.
- 6) Añadir la cantidad de tampón de electroforesis (al cual se le ha añadido 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la solución de Bromuro de etidio) necesaria para que cubra totalmente el gel.
- 7) Adicionar a las muestras 0,25 volúmenes de tampón de muestras x 5 (0,1 % SDS; 40 mM EDTA pH 8,0; 30% Ficoll, 0,25% Azul de bromofenol). Calentar 10 minutos a 65°C y sembrarlas en el gel.

- 8) Aplicar un voltaje constante de 50 voltios y dejar correr hasta que el Azul de bromofenol alcance las 2/3 partes del gel.
- 9) Visualizar el gel a través de un transiluminador de luz de onda media 302 nm.

ANOTACIONES:

- La cantidad de DNA a aplicar depende del número de fragmentos que tenga y de su longitud. En un minigel se aplicaron 100 ng de DNA por banda. Sin embargo se pueden detectar hasta 10 ng de DNA.

- Hay que hacer constar que para la purificación de fragmentos concretos de DNA por el método descrito por Langridge (89) se utilizó agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad), la cual posee la propiedad de fundir a 65- 70°C y solidificar por debajo de los 30°C. En estos casos las fases de preparación del gel y de electroforesis, se realizaron a baja temperatura (4°C).

2.17.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA- SDS.

Los productos de traducción "in vitro" se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS (88).

Los geles se forman por polimerización del monómero acrilamida y el dímero bisacrilamida. La reacción de polimerización es iniciada por los radicales libres que se forman al reaccionar el Persulfato amónico y el TEMED. Una vez iniciada, la polimerización continúa por ella misma.

Los geles se confeccionaron según el método de Laemmli. Los geles se prepararon al 10% acrilamida con una proporción de acrilamida- bisacrilamida de 40:2. La polimerización del gel se hizo entre dos placas de vidrio (16x 24 cm) separadas por tiras de metacrilato de 1 mm de grueso. Las tiras se colocaron en la parte inferior y en los laterales de las placas, el conjunto se sujetó con unas

pinzas y se sellaron las juntas con una solución de agar al 1,5%. Una vez solidificado el agar, se procedió a la preparación del gel.

Con la finalidad de mejorar la resolución del gel, se confeccionó un gel de composición discontinua: Un gel superior o apilador relativamente corto (4- 6 cm) y con una concentración de acrilamida del 5% y un gel inferior o separador más largo (15- 17 cm) con una concentración final de acrilamida del 10%. La función del apilador es la de concentrar las muestras. Las proteínas se mueven con relativa facilidad entre las mallas del gel apilador y se acumulan en la interfase entre los dos geles. Esto hace que en el momento de entrar las proteínas en el gel separador, se encuentren formando una banda estrecha, siendo en el gel inferior donde realmente tiene lugar la separación de las diferentes proteínas.

PROCEDIMIENTO:

1) Preparar la solución del gel separador según:

| | | |
|---|-------|---------|
| Acrilamida 40% | 6,25 | ml |
| Bisacrilamida | 3,25 | ml |
| Tampón de separación (Tris-ClH 1,5 M pH 8,8 + 0,4% SDS) | 6,25 | ml |
| Persulfato amónico 10% | 300 | μ l |
| TEMED | 18,75 | μ l |
| H ₂ O | 8,93 | ml |

- 2) Verter la solución entre las dos placas, inmediatamente después de adicionar el TEMED o el persulfato amónico, hasta una altura apróximada de 17 centímetros. Adicionar 2-3 ml de alcohol isopropílico, que además de evitar el contacto del gel con el aire, proporciona una superficie recta.
- 3) Dejar polimerizar el gel como mínimo media hora.
- 4) Sacar por decantación el alcohol isopropílico, lavar con agua. Secar con un papel de filtro la superficie del gel y colocar la plantilla para la formación de bolsillos

de tamaño conveniente.

5) Preparar la solución del gel apilador según se describe a continuación:

| | | |
|------------------------------|------|----|
| Acrilamida 40% | 0,75 | ml |
| Bisacrilamida 2% | 0,40 | ml |
| Tampón del gel apilador: | | |
| (1 M Tris-ClH pH 6,8 + | | |
| 0,4% SDS) | 1,25 | ml |
| Persulfato amónico 10% | 135 | l |
| TEMED | 10 | l |
| H ₂ O | 7,60 | ml |

6) Añadir rápidamente el gel apilador, a la placa, y dejar polimerizar durante media hora.

7) Sacar el formador de bolsillos y lavar los bolsillos formados con tampón de electroforesis (0,025 M Tris; 0,192 M glicina ; 0,1% SDS pH 8,3)

8) Sacar la tira de metacrilato colocada en la parte inferior de las placas de vidrio y colocarlas en la cubeta de electroforesis. Llenar la cubeta con tampón de electroforesis y sacar las burbujas de aire atrapadas en la parte inferior del gel.

9) Preparar las muestras añadiendo una solución reductora a una concentración final de 5% (P/V) SDS; 5% (V/V) 2-mercaptoetanol; 0,33% (P/V) EDTA y 125 mM Tris pH 6,8.

10) Calentar las muestras 3 minutos a 100°C.

11) Adicionar sacarosa y azul de bromofenol a una concentración final del 0,5% (P/V) y 0,0125% (P/V) respectivamente. Seguidamente aplicarlas en el gel.

12) Conectar los electrodos a una fuente de alimentación (electrodo positivo en la parte inferior del gel) y desarrollar el gel a 13 mA (amperaje constante) hasta que el azul de bromofenol alcance 1 cm del margen inferior del gel.

13) Desconectar los electrodos, separar las dos placas de vidrio y teñir el gel durante 30 minutos en una solución de 50% TCA; 0,2% Azul de Coomassie

- 14) Desteñir el gel durante varias horas con una solución desteñidora (30% metanol + 70% ácido acético en agua)
- 15) En el caso de muestras radioactivas, tratar seguidamente el gel tal y como se detalla en el apartado 2.19, para poder identificar las proteínas marcadas.

2.18. EXPRESION DE GENES EN MAXICELULAS.

Cuando E.coli es sometida a una radiación con luz ultravioleta ve dañado su DNA de manera selectiva. La radiación ultravioleta a 260 nm actúa preponderadamente sobre los ácidos nucleicos, afectando sobre todo a las bases pirimidínicas.

Mutaciones que afectan al gen recA y uvrA inactivan el mecanismo por el cual la célula es capaz de reparar los daños causados en su DNA, por acción de la luz U.V. La irradiación con luz U.V. produce una inhibición de la transcripción debida a los dímeros de pirimidina formados, a la vez que se produce una degradación extensiva del DNA cromosómico por acción de nucleasas intracelulares. La incubación de estas "maxicélulas" no lleva a la síntesis proteica debido a que carecen de DNA para la transcripción. Sin embargo si estas células contienen un plásmido multicopia, alguna molécula plasmídica puede escapar a la irradiación ya que son de menor tamaño que el DNA cromosómico bacteriano y además se encuentran en un estado superenrollado. Así, estos plásmidos sirven como molde para la transcripción, y las proteínas codificadas por estos pueden ser marcadas de forma selectiva por adición de aminoácidos radioactivos.

La cepa utilizada fué la C600 recA⁻ previamente transformada con plásmidos recombinantes del vector pUC18 y pBR322, según se describe en el apartado 2.15.

El método utilizado es descrito por Stoker et al.(146).

PROCEDIMIENTO:

- 1) Inocular 10 ml del cultivo deseado con una colonia aislada de la cepa C600 recA⁻ (previamente transformada con el plásmido recombinante, cuyas proteínas se quieran expresar).
- 2) Diluir el cultivo 20 veces en un medio que contenga

hidrolizado de caseína al 1%. Incubar a 37°C has una absorbancia de 0,5 a 430 nm.

3) Transferir 10 ml del cultivo a una placa petri de 9 cm de diámetro. Irradiar con una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm a una dosis de 40 Jm^{-2} , con suave agitación para que ninguna pueda escapar a la irradiación.

4) Transferir 5 ml del cultivo irradiado a un matraz erlenmeyer estéril bien tapado con papel de aluminio para evitar fenómenos de fotoreactivación. Incubar 1 hora a 37°C con agitación.

5) Añadir D-cicloserina a una concentración final de $100 \mu\text{g/ml}$ e incubar 16-20 horas a 37°C con constante agitación.

6) Transferir 1 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga estéril y recoger las células por centrifugación en una microcentrifuga eppendorf durante 2 minutos. Desechar el sobrenadante.

7) Resuspender el sedimento celular en 0,5 ml de medio mineral (SM) y recoger las células de nuevo por centrifugación.

8) Repetir el paso 7.

9) Resuspender el sedimento en 0,5 ml de medio mineral (SM) que contenga $100 \mu\text{g/ml}$ de D-cicloserina.

10) Adicionar $3 \mu\text{l}$ de una mezcla de aminoácidos preparada según se describe en las anotaciones de este apartado.

11) Incubar a 37°C durante 1 hora.

12) Adicionar $25 \mu\text{Ci}$ de ^{35}S metionina e incubar a 37°C durante 1 hora con agitación intermitente.

13) Añadir $10 \mu\text{l}$ de una solución de metionina (8 mg/ml) e incubar 5 minutos más.

14) Recoger las células por centrifugación (2 minutos en una microcentrifuga eppendorf). Desechar el sobrenadante.

15) Resuspender el sedimento celular en medio mineral (SM) y añadir $50 \mu\text{l}$ del tampón de muestras (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol; 2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol y

0,001% (P/V) azul de bromofenol). Hervir las muestras durante 3 minutos.

16) Aplicar 25 μ l de la muestra resultante en un gel de poli-acrilamida-SDS. Guardar los restantes 75 μ l a -20°C .

17) Después de la electroforesis, se debe someter el gel a una fluorografía para poder detectar las proteínas marcadas.

ANOTACIONES:

El medio de cultivo de elección es un medio mínimo suplementado con hidrolizado de caseína. El uso del LB no es aconsejable porque posee sustancias que absorben al ultravioleta e interfieren con la irradiación de las células.

Después de irradiadas, las células se incuban a 37°C durante 1 hora para que las bacterias que han sufrido algún daño en su DNA dejen de crecer.

El sistema de expresión en maxicélulas es más seguro si se utilizan plásmidos de pequeño tamaño y que estén en un alto número de copias (129). Los plásmidos multicopia semejantes al ColE1 y cuyo DNA no ha sido dañado por la irradiación continúan replicándose. Con plásmidos multicopia los niveles de DNA se incrementan 10 veces después de 6 horas de incubación en células que han visto degradado su DNA en un 80%.

La irradiación suministrada fué de 40 Jm^{-2} ya que se utilizó una cepa que tenía alterado el sistema de reparación del DNA por una única mutación en el gen recA, en contraposición a otros sistemas con múltiples mutaciones.

Después de ser irradiadas, las células deben protegerse de la luz ya que pueden fotoreactivarse fácilmente por acción del gen phr⁺.

La composición de la mezcla de aminoácidos añadida en el punto 10 es la siguiente:

| | |
|------------------|-------------|
| D,L-Alanina..... | 409 μ M |
| L-Arginina..... | 175 μ M |

| | | |
|---------------------|-----|---------------|
| L-Asparragina..... | 38 | μM |
| L-Aspártico..... | 38 | μM |
| L-Cisteína..... | 122 | μM |
| L-Glutámico..... | 113 | μM |
| L-Glutamina..... | 2 | mM |
| Glicina..... | 273 | μM |
| L-Histidina..... | 73 | μM |
| L-Isoleucina..... | 88 | μM |
| L-Leucina..... | 160 | μM |
| L-Lisina..... | 346 | μM |
| L-Fenilalanina..... | 76 | μM |
| L-Prolina..... | 325 | μM |
| L-Serina..... | 532 | μM |
| L-Treonina..... | 252 | μM |
| L-Triptófano..... | 69 | μM |
| L-Tirosina..... | 73 | μM |
| L-Valina..... | 188 | μM |

2.19 DETECCION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS POR FLUOROGRAFIA.

Esta técnica se emplea para la detección de las proteínas separadas por electroforesis, cuando éstas estaban marcadas con radioisótopos emisores de partículas de baja energía, como es el caso del ^{35}S , las cuales no podrían ser detectadas por la técnica de autoradiografía indirecta.

El proceso consiste esencialmente en impregnar el gel con un compuesto centelleador que transformará la energía de las partículas emitidas en una radiación lumínica, la cual a su vez, es la responsable de impresionar la placa fotográfica adjunta.

2.19.1. METODO DEL SALICILATO SODICO.

Una de las principales ventajas de este método con respecto al que detallaremos en el apartado 2.19.2. es su rapidez, gran penetrabilidad en el gel y el uso de reactivos muy sencillos de preparar como es el salicilato sódico.

El protocolo seguido fué el descrito por Chamberlain (36), el cual puede aplicarse tanto a geles sometidos al proceso previo de tinción y destinción, como a geles sometidos simplemente al proceso de fijación de proteínas.

PROTOCOLO:

- 1) Después de desteñir el gel con ácido acético al 7% sumergirlo en agua destilada para eliminar el ácido. Incubarlo en ella durante 30 minutos.
- 2) Eliminar el agua por aspiración y añadir 250 ml de una solución 1 M de salicilato sódico pH 5,7. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Colocar el gel encima de un papel Whatman 3MM previamente humedecido en agua y cubrirlo con una hoja de acetato.

- 4) Secar el gel al vacío, a 80°C, en un secador de geles GSD-4 de Pharmacia, durante 1 hora.
- 5) Colocar el gel seco en un chasis metálico, en ausencia de luz, en estrecho contacto con una película autorradiográfica tipo MAFE RP-X1.
- 6) Cerrar el chasis y colocarlo a -80°C durante un tiempo de exposición adecuado.
- 7) Dejar atemperar la película y revelar la misma manualmente, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

ANOTACIONES:

Antes de proceder al tratamiento del gel con salicilato sódico, se debe proceder a eliminar los restos de ácido acético existentes, que podrían conducir a la precipitación del salicilato sódico.

El tratamiento con el salicilato sódico provoca una difusión de las bandas del gel, si bien este fenómeno no ha podido ser todavía explicado.

2.19.2. METODO DEL DMSO/PPO.

El protocolo seguido es el descrito por Hames y Rickwood (71), que no es más que una adaptación de las técnicas propuestas por Laskey y col. (22) . Se basa en la interacción entre las partículas emitidas por el ³⁵S y el 2,5-difeniloxazol (PPO) que produce una emisión de luz la cual provoca el ennegecimiento local de la película de rayos X.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Sumergir el gel en 20 volúmenes de dimetilsulfóxido (Me₂SO) durante 30 segundos.
- 2) Pasar el gel a una solución nueva de dimetilsulfóxido

e incubarlo durante 30 minutos.

- 3) Sumergir el gel en 4 volúmenes de PPO al 20% (P/V) en dimetilsulfóxido durante 3 horas.
- 4) Pasar el gel a un recipiente con 20 volúmenes de agua y dejarlo durante 1 hora.
- 5) Secar el gel al vacío durante 1 hora.
- 6) Proceder según los pasos 5 al 7 del apartado 2.19.1.

ANOTACIONES:

Con este tratamiento se incrementa considerablemente la sensibilidad del método de detección, a la vez que se consigue establecer una relación de proporcionalidad entre la absorbancia de la imagen fluorográfica y la radioactividad de la muestra.

El dimetilsulfóxido es un potente deshidratante, que elimina el agua del interior de la matriz del gel y por otra parte permite la solubilización del PPO y la entrada de éste al interior del gel. La precipitación del PPO se produce por adición de agua, ya que éste es insoluble en ella.

2.20. AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA.

La autorradiografía indirecta fué la técnica de elección para la visualización de fragmentos de DNA, marcados con ^{32}P , por su alta sensibilidad.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Fijar los filtros de nitrocelulosa encima de una cartulina. Colocarlos en un chasis metálico en ausencia de luz y dotado de dos pantallas intensificadoras (Micron R o Dupont H-plus).
- 2) Colocar en contacto con el filtro de nitrocelulosa una película autorradiográfica, tipo MAFE RP-X1.
- 3) Cerrar el chasis y colocarlo a -80°C con objeto de obtener una respuesta lineal.
- 4) Dejar transcurrir el tiempo de exposición necesario dependiendo de la radioactividad existente en el gel.
- 5) Revelar la película impresionada de forma manual.

ANOTACIONES:

-Cabe destacar la gran sensibilidad de la película MAFE RP-X1 a la luz, por lo que la colocación de la misma en el interior del chasis se hará en total oscuridad.

-El revelado de la película impresionada se seguirá con ayuda de una luz roja.

2.21. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS.

Los productos y reactivos utilizados en el presente trabajo han sido suministrados por las siguientes firmas comerciales:

BIO-RAD LABORATORIES. Richmond, Ca., E.U.A.

Agarosa (de bajo punto de fusión)
Azul brillante de Coomasie
Dodecil sulfato sódico (SDS)
N-N'-metilenbisacrilamida
Persulfato amónico
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED)

BOEHRINGER MANNHEIM gmbh. Mannheim, Alemania.

Ampicilina sódica
BamHI
DNAsaI
DNA polimerasa I
EcoRI
HindIII
lisozima
PstI
SalI
SacI
XmaI
XhoI

CARLO ERBA. Milá, Italia.

Alcohol butílico
Alcohol etílico
Alcohol isoamílico
Alcohol isopropílico
Alcohol metílico
Cloroformo
Fenol
Formamida

COMMISARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE. Gif-Sur Yvette. Francia.

^{14}C -ramnosa

CULTEK. Barcelona.

BglI

BglIII

KpnI

PvuI

PvuII

SmaI

DIFCO. Detroit, Mich. E.U.A.

Antibiotic medium n° 3

Bacto-agar

Bacto-casaminoácidos (hidrolizado de caseína)

Bacto-extracto de levadura

Bacto-peptona

Bacto-triptona.

FEROSA (reactivos SCHARLAU). Barcelona.

Dioxano

2,5-difeniloxazol (PPO)

1,4 bis (5 feniloxazol-2-il)-benceno (POPOP)

Naftaleno

FLUKA A.G. Buchs, Suiza

Acrilamida

MERCK. Darmstadt, R.F. Alemania

Acétato potásico

Ácido clorhídrico

Ácido sulfúrico

Ácido tricloroacético

Azul de bromofenol

Carbazol

Citrato trisódico

Cloruro cálcico

Cloruro potásico

Cloruro de cesio
Cloruro manganoso
Cloruro magnésico
Cloruro de rubidio
Cloruro sódico
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Etilendiaminotetracético (EDTA-Na)
Ficoll
Fosfato dipotásico
Fosfato sódico
Glucosa
Hidróxido potásico
Hidróxido sódico
2-Mercaptoetanol
Polivinilpirrolidona
Sacarosa
Sulfato amónico
Sulfato ferroso
Sulfato magnésico
Tolueno

NEW ENGLAND NUCLEAR

^{32}P -ATP

^{35}S -metionina

SHOT IBERICA (SCHEILER AND SCHULL). Barcelona

Papel de nitrocelulosa BA-83

SIGMA CHEMICAL Co. St. Louis, Mo E.U.A

Agarosa (de baja electroendosmosis)

D,L-alanina

Albúmina sérica bovina

L-arginina

L-asparragina

L-aspártico

Adenosina-5'-trifosfato (ATP)

5-bromo-4-cloro-3-indolil- -galactopiranosido (X-gal)
Bromuro de etidio
Bromuro de hexadeciltrimetilamónio (CETAB)
D-cicloserina
L-cisteina
Cloranfenicol
Cristal violeta
DNA de testículos de salmón
Espermidina
Fenilalanina
Fosfomicina
L-glutámico
L-glutamina
Glicina
Glicerol
8-hidroxiquinoleina
L-histidina
Isoleucina
Isopropiltiogalactósido (IPTG)
Kanamicina
L-leucina
L-lisina
L-metionina
2(N-morfolino)etona sulfónico ácido (MES)
Marcadores de bajo peso molecular para electroforesis
L-prolina
Putrescina
Ramnosa
RNasa A
L-serina
tagatosa
tiamina
L-tirosina
L-treonina
L-triptofano
Tris(hidroximetil) amino metano (Tris)

Triton X-100

L-valina

Whatman.

Papel whatman chroma n^o3

Papel Whatman chroma n^o1

3. RESULTADOS.

3.1 OBTENCION Y CARACTERIZACION DE FAGOS RECOMBINANTES CONTENIENDO PARTE DEL LOCUS rha.

El aislamiento de genes y el estudio de la expresión génica en organismos procariotas, ha sido realizado en gran parte mediante la utilización de fagos de transducción especializada, en especial los derivados del bacteriófago lambda. (62,64).

Los fagos de transducción especializada se forman por la escisión conjunta del profago con un fragmento adyacente de DNA bacteriano. Estos fagos recombinantes son capaces de replicarse y empaquetarse con la misma eficiencia que el fago lambda tipo salvaje. (134).

Así, la clonación del operón de la ramnosa se ha iniciado mediante la utilización del fago lambda cI857 b515 b519 xis6S7 insertado en el locus rha de la cepa ET 1248 (33).

Este fago se caracteriza por poseer una mutación temperatura sensible en el gen cI por lo que se puede inducir su escisión del cromosoma bacteriano por un incremento de temperatura desde 30 a 42°C. (147).

Además posee una mutación en el gen xis que favorece la escisión anormal del profago, incorporando de este modo en su genoma hasta unas 20 kb de DNA genómico foráneo. Típicamente la capacidad de empaquetamiento de la cápside del fago es de unas 50 kb (83) de las que sólo le son imprescindibles unas 30 kb para su replicación. (83,108, 120).

La integración del fago lambda en el cromosoma bacteriano es posible debido a fenómenos de recombinación entre el fago y el cromosoma bacteriano gracias a la existencia de secuencias homólogas específicas entre ambos DNAs que se denominan att (attachment site) (66) y a la presencia de una proteína codificada por el gen int del fago que actúa promoviendo la recombinación de las secuencias att.

El fago lambda se fija siempre a un punto totalmente específico del cromosoma bacteriano y justamente en un punto situado entre el locus gal y el locus bio, sin embargo cuando el fago utilizado posee alguna mutación que afecte al gen int, el fago lambda se integra con una menor frecuencia y además, inespecíficamente en muchos puntos distintos del DNA bacteriano. (107).

3.1.1 INDUCCION DE LA FASE LITICA EN LA CEPA LISOGENICA ET 1248

La obtención de fagos a partir de la cepa lisogénica ET 1248, se realizó según el protocolo descrito por Schrent y Weisberg (134). Así dicha cepa se hizo crecer en un medio rico (LB) a la temperatura permisiva de 32°C hasta una densidad de 4×10^8 células por ml y seguidamente se incubó a 41°C durante 30 minutos, con el fin de producir la inducción de los profagos que se hallaban insertados en el locus rha de la cepa ET 1248. A esta temperatura se inactiva la proteína represora, producto del gen cI, y que reprime la transcripción de los genes del fago cuando está en estado lisogénico, con lo que se inicia la fase lítica del fago.

Tras incubar durante 2 horas a 37°C, las células fueron recolectadas por centrifugación a 8000 x g y se resuspendieron en un volumen 100 veces menor de LB. Dado que el fago inducido posee una mutación en el gen S, que codifica un componente de las funciones de lisis del huésped, los fagos se obtuvieron por tratamiento de las células con cloroformo (1:100 v/v) a 37°C durante 15 minutos con agitación. Después de eliminar los restos celulares por centrifugación, se utilizó el sobrenadante como material de partida para la selección de los fagos recombinantes.

3.1.2 SELECCION DE FAGOS RECOMBINANTES

Los fagos obtenidos por inducción térmica, a partir de la cepa ET 1248, se sometieron a procesos de selección con el fin de identificar y aislar fagos recombinantes.

Uno de ellos está basado en el tamaño del genoma del fago. Se ha puesto de manifiesto que las cepas Pel^- se caracterizan por inhibir la penetración de DNA de pequeño tamaño. En el caso del fago lambda, permite preferencialmente la propagación de aquellos fagos que han incrementado el tamaño de su genoma por incorporación de un fragmento de DNA genómico (27,160). Así se infectó la cepa JM222 (Pel^-) con una alícuota del lisado fágico obtenido y se sembró en placas de LB. No fué posible detectar placas de lisis por este procedimiento después de incubar hasta 15 horas a 37°C repetidas siembras. Estos resultados negativos nos llevaron a ensayar un segundo método de selección.

Este segundo método se basaba en la identificación de fagos recombinantes por su fenotipo Spi^- que se caracteriza por crecer sobre cepas lisogénicas del fago P2 como consecuencia de mutaciones en los genes red y gam (107,168,169).

Los fagos recombinantes capaces de crecer en cepas lisogénicas de P2 han perdido los genes red y gam, situados en posición adyacente al locus att como consecuencia de su reemplazamiento, en el proceso de excisión aberrante, por DNA genómico de la bacteria en la que estaban insertados (figura 8).

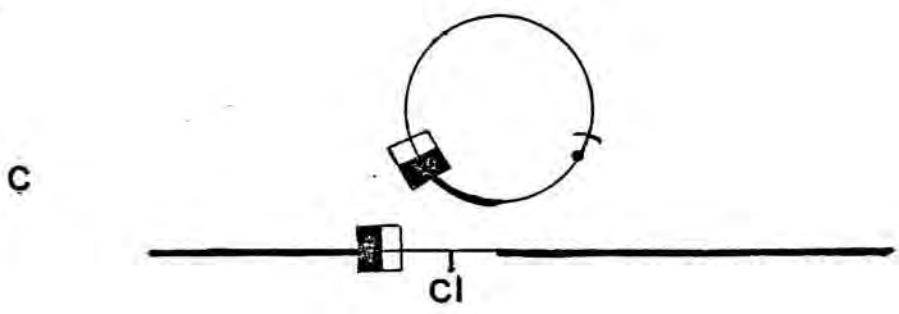
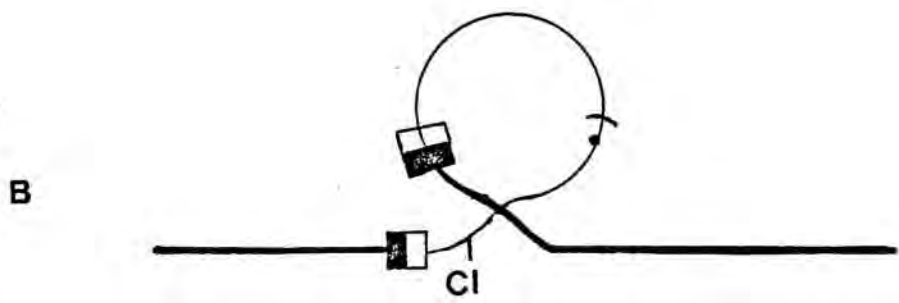
A fin de seleccionar fagos recombinantes con el fenotipo Spi^- se procedió a la infección de las cepas NM528 y Q359 (ambas lisogénicas de P2) con una alícuota del lisado obtenido según se detalla en el apartado 3.1.1. Tras incubación a 37°C durante 15 horas, se observó la presencia de más de 200 placas de lisis.

Se escogieron clones bien aislados, de los cuales se seleccionaron al azar, y que denominamos lambda prhal y lambda

FIGURA 8. ESCISION DEL FAGO LAMBDA, GENERADORA DE FAGOS CON GENOTIPO S_{pi}^- .

El esquema representa el proceso de escisión aberrante del fago lambda cIts insertado en una posición distinta a la de los puntos de fijación marcada por los operones gal y bio (A). La escisión aberrante del fago da lugar a recombinación entre el DNA genómico (—) y el DNA fágico (—) por la derecha de uno del locus att (B). La recircularización del fago se completa por recombinación entre dos loci que no corresponden a att perdiendo en este proceso el locus cI y los genes red y gam próximos a él (C).

La linearización por apertura de los extremos cos (→•) (D) del fago muestra la localización del DNA genómico en el fago infectivo.



prha2 para su posterior estudio. Estos clones se amplificaron de forma independiente sobre la cepa NM528, en medio líquido, según se describe en el apartado 2.6.1. y se purificaron por centrifugación en gradiente discontinuo de Cloruro de cesio (apartado 2.6.3).

Una alícuota de cada una de las preparaciones fágicas fué tratada según se detalla en el apartado 2.6.4. para obtener su DNA y proceder a su caracterización.

3.1.3. CARACTERIZACION DE LOS FAGOS RECOMBINANTES LAMBDA prha1 Y LAMBDA prha2

Se procedió a digerir el DNA de los fagos lambda prha1 y lambda prha2 con los enzimas de restricción KpnI, EcoRI BamHI y HindIII.

Los fragmentos generados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% y el tamaño de los mismos fué determinado utilizando como marcador de peso molecular DNA de lambda digerido con HindIII (figura 9).

Una vez determinado el tamaño y número de fragmentos generados por acción de las distintas endonucleasas de restricción en los fagos lambda prha1 y lambda prha2 y conociendo además el tamaño y ordenación de los fragmentos obtenidos por digestión del DNA del fago progenitor (cI857 b515 b519 xis6 S7) con las mismas endonucleasas de restricción, se pudo determinar que los fagos recombinantes poseían una inserción de DNA genómico de E. coli de al menos 6,8 Kb en el fago lambda prha1 y 7,6 Kb en el fago lambda prha2. Inserción que lógicamente arranca de locus att (attachement) y se extiende hacia la derecha del mismo, ver esquema. Figura 10.

FIGURA 9. DIGESTION DEL DNA DE LOS FAGOS LAMBDA prha1 Y LAMBDA prha2 CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCION.

La fotografia muestra los fragmentos generados por digestión del DNA de los fagos lambda prha1 y lambda prha2 con los siguientes enzimas de restricción:

- 2) KpnI (prha1)
- 3) EcoRI (prha1)
- 4) BamHI (prha1)
- 5) HindIII (prha1)
- 7) HindIII (prha2)
- 8) BamHI (prha2)
- 9) EcoRI (prha2)
- 10) KpnI (prha2)

Asi mismo, en 1) se muestra el DNA del fago lambda, sin digerir y en 6) se muestran los fragmentos generados por digestión del DNA del fago lambda tipo salvaje con el enzima HindIII. Estos fragmentos se utilizan como marcadores de peso molecular.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

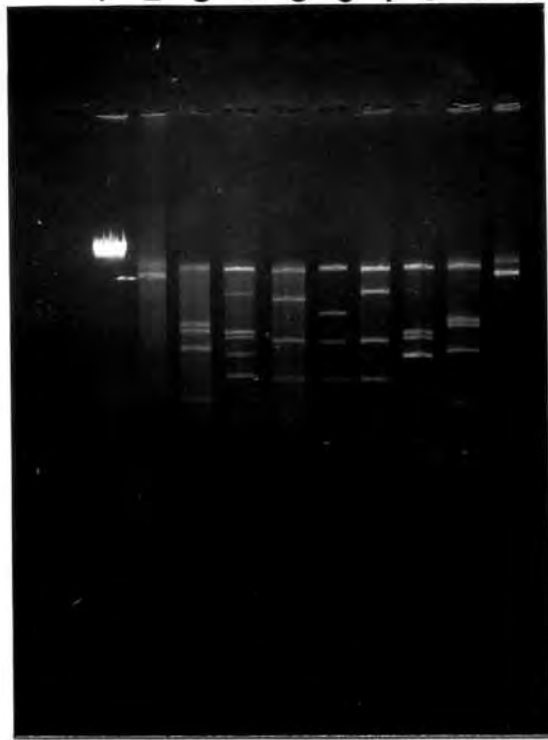
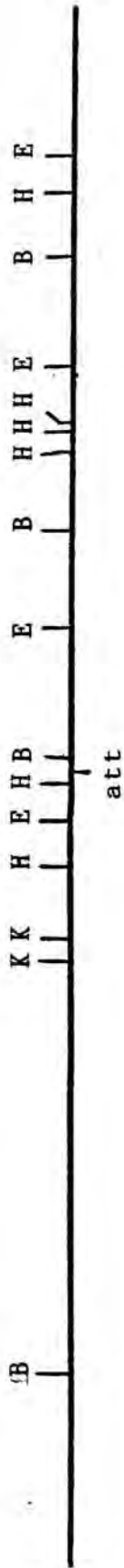


FIGURA 10. MAPA FISICO DE LOS FAGOS LAMBDA cI857 b515 b519 xis6 S7, LAMBDA prhal y LAMBDA prha2 RESPECTIVAMENTE.

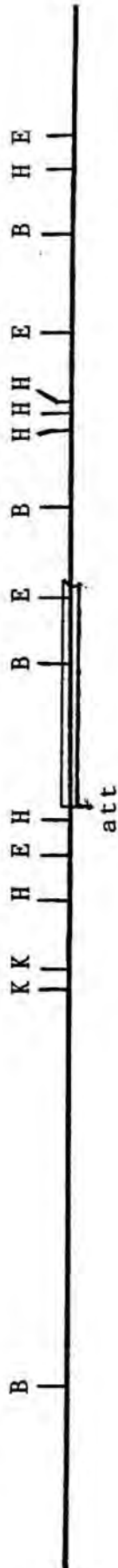
En el esquema se muestra la localización de las dianas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII y Kpn dentro del genoma de los tres fagos antes mencionados.

Con trazo fino se representa el DNA perteneciente al genoma del fago y con trazo grueso se representa el DNA clonado perteneciente al genoma de E.coli.

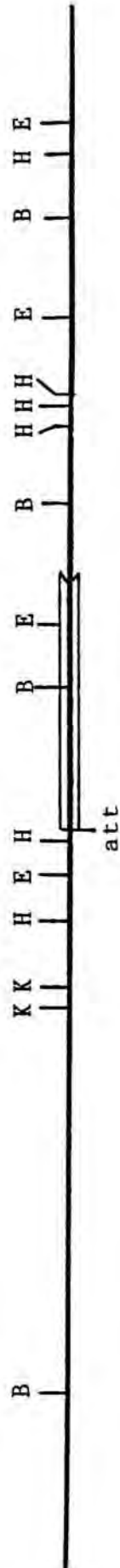
AcI857 b515 b519 xis6 S7



Aprha1



Aprha2



3.2 AISLAMIENTO A PARTIR DEL FAGO RECOMBINANTE LAMBDA prha2 DE UN FRAGMENTO DE DNA GENOMICO CORRESPONDIENTE AL LOCUS rha DE E. COLI

El tratamiento con las endonucleasas de restricción KpnI, EcoRI, BamHI y HindIII del DNA de los fagos lambda prha1 y lambda prha2 no genera ningún fragmento que pertenezca únicamente al genoma de E. coli (figura 10). Para ello fué necesario la localización de nuevas dianas de restricción en los fragmentos de DNA genómico clonados. Sin embargo, este objetivo era difícil de conseguir si se abordaba directamente sobre el DNA de los fagos lambda prha1 y lambda prha2, dada la complejidad de interpretación de los múltiples fragmentos generados por el tratamiento con algunas endonucleasas de restricción cuando el DNA genómico se halla insertado en el DNA del fago.

3.2.1 CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pJB1 CONTENIENDO UN FRAGMENTO EcoRI- EcoRI DEL FAGO LAMBDA prha2

Para proceder al estudio detallado del fragmento de DNA genómico de E. coli clonado en los fagos recombinantes, se procedió a subclonar el fragmento EcoRI de 6,6 Kb del fago lambda prha2 en el plasmido pUC18. Con este fin se procedió a digerir una alícuota del DNA del fago lambda prha2 y del plásmido pUC18 con el enzima EcoRI.

Tras comprobar por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% que las digestiones eran completas, se procedió a la inactivación del enzima EcoRI por calentamiento de las muestras a 65°C durante 10 minutos. A continuación se incubaron 10.5 g del DNA del fago con 0.15 g del vector en presencia de DNA ligasa de T₄ (2 unidades).

Posteriormente se procedió a transformar células competentes de la cepa JM109 según la metodología descrita en el apartado 2.15.1.2 y a seleccionar las bacterias conteniendo los plásmidos recombinantes en placas de LB-amp-X-gal-IPTG.

De los 20 transformantes obtenidos, seis eran incapaces de hidrolizar X-gal y dos fueron seleccionados para su posterior caracterización. Tras proceder a la obtención de su DNA según el método descrito en el apartado 2.16.1, se analizó su tamaño molecular mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% identificándose dos plásmidos que presentaban un tamaño mayor. Su digestión con EcoRI, permitió determinar que uno de ellos, al que se denominó pJBI, contenía el fragmento EcoRI de 6,6 Kb de DNA genómico antes citado.

3:2.2 MAPA DE RESTRICCIÓN DEL PLASMIDO pJBI

El plásmido pJBI obtenido según se describe en el apartado anterior, posee el fragmento de 6,6 Kb de DNA foráneo, del cual 1,3 Kb corresponde al DNA del fago lambda y 5,3 Kb al DNA de E.coli. (figura 11).

Con el fin de localizar otras dianas de restricción dentro del fragmento clonado, se procedió a digerir alícuotas del plásmido pJBI con distintos enzimas de restricción (ver tabla 5).

La diferencia entre las dianas totales en pJBI y las pertenecientes a pUC18 y al fragmento de DNA de lambda insertado permitió determinar las dianas pertenecientes al fragmento de DNA de E.coli insertado en pJBI, así se hallaron 4 dianas BglI, 2 dianas pstI, 2 dianas PvuI y 1 diana PvuII. No se hallaron dianas para BglIII, SacI, Sall, XbaI y XhoI.

La localización exacta de las dianas de restricción PstI, PvuI, PvuII y BglI en el fragmento de DNA clonado, se determinó con la ayuda de digestiones dobles con distintos enzimas de restricción según se detallan a continuación:

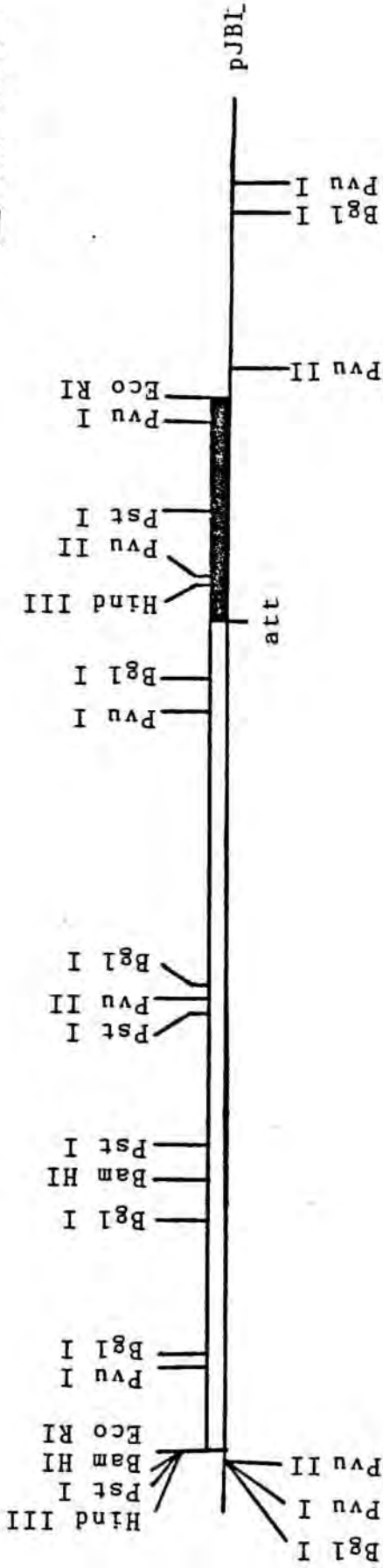
- PvuII + BamHI
- PvuI + BamHI
- PvuI + HindIII

FIGURA 11. MAPA FISICO DEL PLASMIDO pJB1.

— DNA pUC18

□ DNA E.coli

■ DNA Lambda



DNA Plásmido 10.60

DNA Insertado..... 7.85 { 1.62 Kb (DNA Lambda)
6.23 Kb (DNA E.coli)

1000 bp

TABLA 5
 DETERMINACION DE DIANAS EN EL FRAGMENTO DE E. COLI INSERTADO EN EL PLASMIDO pJBI

| Enzima de restric- ción utilizado | Dianas tota- les en pJBI | Dianas pertene- cientes a pUC18 | Dianas pertene- cientes al frag- mento de DNA de λ | Dianas pertene- ciente al insgr- to de DNA de <u>E. coli</u> |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--|--|
| BglI | 6 | 2 | 0 | 4 |
| BglII | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PstI | 4 | 1 | 1 | 2 |
| PvuI | 5 | 2 | 1 | 2 |
| PvuII | 4 | 2 | 1 | 1 |
| SacI | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SalI | 1 | 1 | 0 | 0 |
| XbaI | 1 | 1 | 0 | 0 |
| XhoI | 0 | 0 | 0 | 0 |

- PstI + BamHI
- PstI + HindIII
- BglI + HindIII
- BglI + PvuI

En la figura 12 se muestran los resultados en alguna de las digestiones realizadas. Pueden estimarse así los tamaños de los fragmentos obtenidos en cada caso, utilizando como marcadores los fragmentos resultantes de la digestión de DNA del fago lambda por la doble digestión EcoRI- Hind III (carril F) y los fragmentos generados por la digestión del pBR322 con HinfI (carril G). La integración de la información obtenida con los tamaños de los fragmentos generados en la serie de digestiones señaladas anteriormente permiten identificar las dianas de restricción PvuI, PstI, PvuII y BglI pertenecientes al DNA de E.coli clonado y cuya localización se muestra en la figura

3.2.3 OBTENCION DE UN FRAGMENTO ESPECIFICO DEL PLASMIDO pJB1 PARA SU UTILIZACION COMO SONDA

El mapa de restricción que se muestra en la figura nos indica la localización de dianas de restricción que permiten el aislamiento de fragmentos específicos pertenecientes al genoma de E.coli. El análisis de esta información permitió determinar como adecuadas para la obtención del fragmento específico, las dianas PvuI y BglI así, se procedió a digerir alícuotas de DNA del plásmido pJB2 con los enzimas PvuI y BglI. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se procedió a la purificación, mediante el método de CETAB (ver apartado 2.8.2.) de los fragmentos BglI de 2,2 y 1,6 Kb. Se comprobó su pureza por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (figura 13).

FIGURA 12. ANALISIS ELECTROFORETICO EN GEL DE AGAROSA AL 1,5% DE LOS PRODUCTOS DE DIGESTION DEL PLASMIDO pJB1 CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Cada carril muestra el resultado de las digestiones, según se indica a continuación:

- A) PvuII
- B) PvuII + BamHI
- C) PvuI
- D) PvuI + BamHI
- E) PvuI + HindIII
- H) PstI
- I) PstI + BamHI
- J) PstI + HindIII

Así mismo en el carril F se muestran los fragmentos generados por digestión del DNA del fago lambda con los enzimas EcoRI + HindIII y en el carril E los fragmentos generados por digestión del pBR 322 con el enzima HinfI.

A B C D E F G H I J K L M



FIGURA 13. ANALISIS DE LA HOMOGENEIDAD DE VARIOS FRAGMENTOS CON POSIBILIDAD DE SER UTILIZADOS COMO SONDA.

La imagen muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% para el BglI de 2,2 Kb (1), el DNA del plásmido pJB1 digerido con BglI (2), el fragmento BglI de 1,6 Kb (3), el DNA del plásmido pJB1 digerido con PvuI (4) y el fragmento PvuI de 4,4 Kb (5).

1 2 3 4 5



El fragmento BglI de 2,2 Kb se seleccionó posteriormente para su utilización como sonda ya que es el más próximo al locus att y se trataba de un fragmento que con mayor probabilidad contenía secuencias del operón rha.

El fragmento BglI de 2,2 Kb previamente purificado, fué marcado radioactivamente por la técnica de "nick translation" con ^{32}P - α dATP (Apartado 2.9) y se utilizó como sonda en localización de fragmentos genómicos homólogos a la misma.

3.3 MAPA FISICO DE UNA REGION CONTENIENDO PARTE DEL OPERON rha

3.3.1 LOCALIZACION DE DIANAS EcoRI Y BamHI MEDIANTE ANALISIS DE FRAGMENTOS GENOMICOS CON HOMOLOGIA A SECUENCIAS DEL OPERON rha

Para poder localizar nuevas dianas de restricción adyacentes al fragmento genómico clonado, se procedió a digerir alícuotas de DNA de E.coli con los enzimas de restricción EcoRI, BamHI, BglI y PvuI. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%, utilizandose como marcador de peso molecular los fragmentos generados por digestión del DNA del fago lambda con el enzima HindIII. (figura 14).

Seguidamente se procedió a la transferencia de los fragmentos generados a un filtro de nitrocelulosa, según el método descrito en el apartado 2.10.

Tras hibridar el DNA retenido en el filtro con la sonda marcada radioactivamente, según se describe en el apartado 2.9, se lavó (apartado 2.11), se secó a temperatura ambiente y se contactó, durante 16 horas a -70°C con una película autorradiográfica del tipo RP- X7 (MAFE), utilizando una pantalla intensificadora Micron R.

El revelado de la película, mostró la distribución de las bandas de hibridación que se muestran en la figura 15, permitiendo evidenciar la existencia de los siguientes fragmentos homologos: en la digestión con EcoRI, un fragmento de 6,6 Kb; en la digestión con BamHI un fragmento de 6,6 Kb; en la digestión con BglI un fragmento de 2,2 Kb que corresponde a la sonda y en la digestión con PvuI un fragmento de 4,8 Kb que comprende parte de la sonda.

El conocimiento de mapa de restricción del plásmido pJB1 y del tamaño molecular de los fragmentos genómicos homólogos al fragmento BglI de 2,2 Kb permitió localizar dos nuevas dianas de restricción que se muestran en la figura 16. Una diana EcoRI que se situaría a 6,6 Kb y

FIGURA 14. DIGESTION DEL DNA DE E.COLI CON DIVERSOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

La imagen muestra la separación electroforética de los fragmentos generados por digestión del DNA de E.coli con: EcoRI (2), BamHI (3), BglI (4) y PvuI (5).

El carril número 1 muestra la distribución de bandas obtenidas por digestión del DNA del fago lambda con el enzima HindIII.

1 2 3 4 5

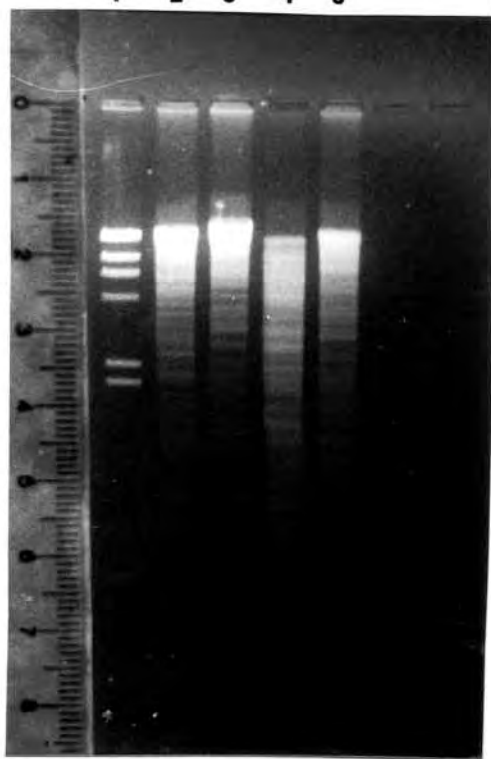


FIGURA 15. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS GENOMICOS DE E.COLI HOMOLOGOS AL FRAGMENTO BglII DE 2,2 Kb UTILIZADO COMO SONDA.

La imagen muestra las bandas de hibridación de la sonda BglII de 2,2 Kb con los fragmentos que se muestran en la separación electroforética de la figura 14, después de su transferencia a papel de nitrocelulosa.

1 2 3 4 5

-23,67

- 9,46

- 6,66

- 4,26

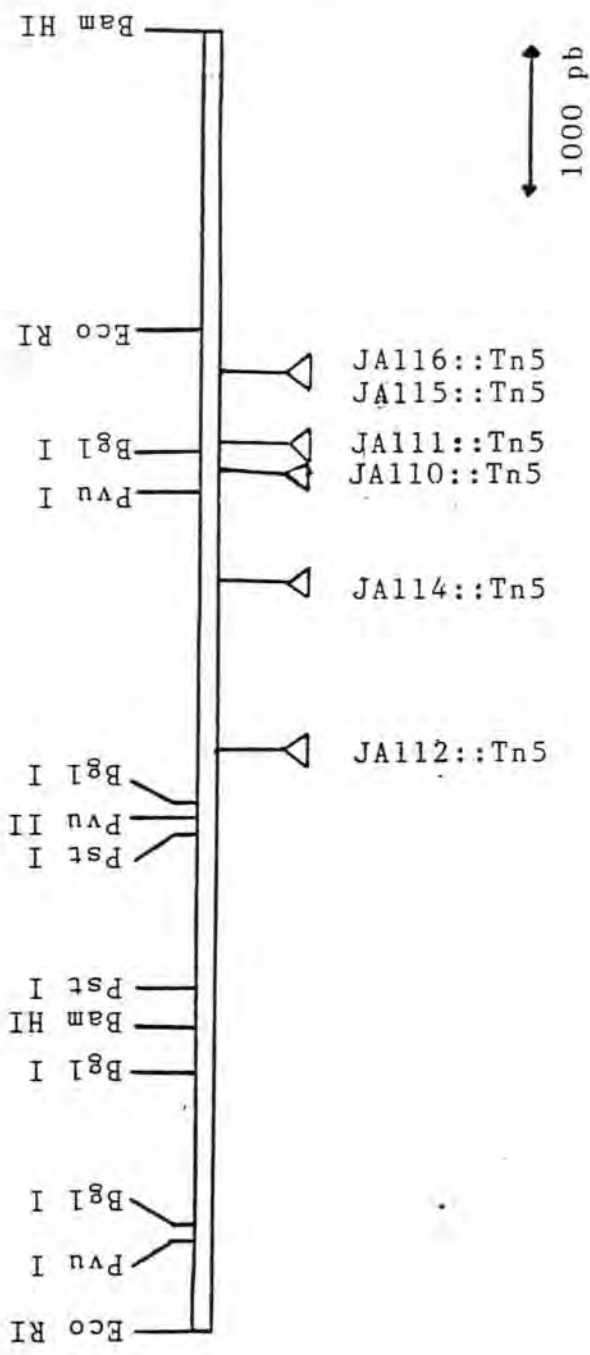
- 2,30

- 1,96



FIGURA 16. EXTENSION DEL MAPA FISICO DE LA REGION CLONADA EN EL PLASMIDO pJB1.

El esquema muestra el mapa físico ampliado con las dianas de restricción EcoRI y BamHI adyacentes a la región clonada en el plásmido pJB1. Así mismo, se muestra la localización de una serie de inserciones del transposón Tn5 que llevan al fenotipo Rha⁻.



y una diana BamHI situada a 8,6 Kb con respecto a la diana EcoRI ya conocida.

3.3.2 VERIFICACION MEDIANTE ANALISIS GENOMICOS DE QUE LA REGION CLONADA CORRESPONDE AL OPERON rha

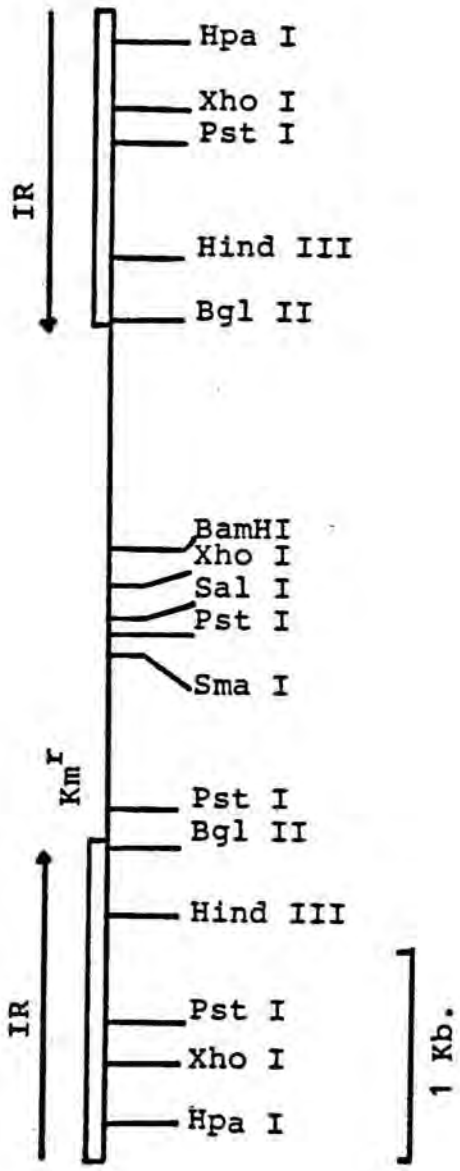
Durante el proceso de clonación del operón de la ramnosa en E.coli, se planteó la posibilidad de obtener mutantes de inserción seleccionados por el fenotipo Rha⁻ a fin de poderlos utilizar en experimentos que permitiesen la comprobación e identificación de que el segmento de DNA clonado pertenecía al operón de la ramnosa.

Así se obtuvieron un grupo de mutantes por inserción del transposón Tn5 en el genoma de E.coli. Este transposón que tiene un tamaño de 5,7 Kb, confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y neomicina. Posee una secuencia central única de 2,4 Kb flanqueada por dos secuencias repetidas e invertidas de 1,45 Kb (53,54). Una de estas secuencias externas, codifica para proteínas que intervienen en la movilidad de este transposón (transposasas), mientras que las secuencias localizadas en el otro extremo, contienen el promotor que permite la expresión del gen que codifica para la resistencia a kanamicina (55,56), que está localizado en el fragmento central. El transposón posee además una única diana BamHI localizada en la parte central del transposón y que divide al mismo en dos fragmentos prácticamente del mismo tamaño (figura 17). Esta diana fué de gran utilidad en la localización de las inserciones del transposón dentro del genoma de E.coli.

Los mutantes Rha⁻ obtenidos por inserción del transposón Tn5 fueron seleccionados por crecimiento en placas de medio MacConkey conteniendo ramnosa (10 mM) y kanamicina (20 µg/ml). Se aislaron 80 colonias blancas en este medio, por tanto incapaces de fermentar el azúcar y supuestamente Rha⁻.

FIGURA 17. MAPA FISICO DEL TRANSPOSON T_n5.

Tn5



Con el fin de eliminar mutantes auxotróficos para algún aminoácido o vitamina se sembraron en placas de LB-km y posteriormente se hicieron replicas sobre placas de medio mínimo conteniendo glucosa, glicerol o ramnosa.

Así, de los 80 clones analizados, 52 presentaron finalmente el fenotipo Rha^- conservando la capacidad de crecer en glucosa y glicerol.

Seguidamente se procedió a la obtención del DNA genómico de 8 de los mutantes de inserción según el método descrito en el apartado 2.5.1.

Alícuotas de los DNAs obtenidos se sometieron al tratamiento con la endonucleasa de restricción BamHI y los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos generados por digestión del DNA del fago lambda con el enzima HindIII y con el EcoRI + HindIII.

Tras la transferencia a un filtro de nitrocelulosa, hibridación del DNA fijado al mismo con la sonda radioactiva correspondiente al fragmento BglI de 2,2 Kb (apartado 2.9) , y posterior revelado autorradiográfico se observó el modelo de las bandas mostrado en la figura 18. Así, la localización de una nueva diana BamHI correspondiente al transposón permitió localizar el lugar de su inserción. Por otra parte la presencia de dos bandas de hibridación correspondía a una inserción en el fragmento usado como sonda que quedaba dividido en dos subfragmentos por efecto de la diana BamHI aportada con la inserción del transposón.

Así, la evidencia de que el fragmento clonado pertenecía al locus rha era doble. Por una parte la localización de las inserciones de Tn5 con fenotipo Rha^- en el fragmento clonado. En otra experiencia encaminada a la identificación del locus rha en nuestro fragmento clonado se utilizó DNA de la cepa DF903 que posee una delección rha-pfkA. La digestión con BamHI, su posterior transferencia

FIGURA 18. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS GENOMICOS DE MUTANTES DE INSERCIÓN Rha^- HOMOLOGOS AL FRAGMENTO BglI DE 2,2 Kb UTILIZADO COMO SONDA.

La imagen muestra las bandas de hibridación con la sonda BglI de 2,2 Kb con los fragmentos generados tras digestión con el enzima BamHI del DNA de los mutantes: JA110 (1), JA111 (2), JA112 (3), JA113 (4), JA114 (6), JA115 (7) y JA116 (8), y posterior transferencia a papel de nitrocelulosa.

En el carril 5 se muestra la ausencia de hibridación en el caso de la digestión de la cepa DF903, que se caracteriza por poseer deletado el locus rha, en el carril 9 y 10 se muestra la débil hibridación inespecífica con el DNA del fago lambda digerido con el enzima HindIII y EcoRI + HindIII respectivamente.



a filtro de nitrocelulosa y su posterior hibridación con la sonda, mostraron una ausencia total de señales de hibridación. (figura 18).

3.4. PREPARACION DE UNA GENOTECA PARCIAL BamHI DE E.COLI EN EL BACTERIOFAGO LAMBDA L47.1.

El bacteriófago Lambda es en la actualidad el vector de clonaje más utilizado, merced al desarrollo del sistema de empaquetamiento in vitro que aumenta enormemente la eficiencia de recuperación de las moléculas recombinantes (77, 145) y a la facilidad de detección de los fagos recombinantes mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (16).

En nuestro caso y con el fin de poder aislar del genoma de E.coli un fragmento BamHI de 6,6 kb con secuencias homólogas al fragmento BglI de 2,2 kb, se procedió a la obtención de una genoteca en el bacteriófago Lambda L47.1.

Para ello 10 μ g del DNA de E.coli (cepa 1) se sometieron a digestión total con BamHI (20 u.). Los fragmentos generados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y a continuación se procedió a la purificación de los fragmentos de tamaño comprendido entre 5 y 8 kb, según el método descrito en el apartado 2.8.2.

Paralelamente se digirieron 5 μ g del DNA del fago Lambda L47.1 con BamHI. La digestión del DNA del fago con este enzima genera tres fragmentos. Los dos de mayor tamaño que se denominan brazos del vector, se caracterizan por poseer en sus extremos secuencias cos que intervienen en la circularización del DNA del fago durante el proceso de infección. El fragmento de menor tamaño es en este caso el que puede ser reemplazado por DNA foráneo en procesos de clonación.

Los brazos del vector fueron purificados mediante técnicas de electroelución en papel de DEAE-celulosa (apartado 2.8.1.).

Seguidamente se procedió a la ligación de 2,5 μ g del DNA de los brazos del vector con 1,25 μ g de fragmentos de DNA genómico mediante la utilización de DNA ligasa de T₄

(4 U.) en un volumen de reacción de 20 μ l y con el tampón de ligación detallado en el apartado 2.14.

La mezcla de ligación fué empaquetada in vitro mediante la utilización de extractos de empaquetamiento, preparados según se indica en el apartado 2.12.2. obteniéndose un rendimiento a partir de los 20 μ l de la mezcla de ligación y en nuestras condiciones, de 7200 p.f.u. La cepa utilizada como huésped fué la C600.

3.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CLONES DE LA GENOTECA CONTENIENDO SECUENCIAS DEL OPERON *rha*.

El método utilizado para identificación de clones recombinantes requiere la unión a filtros de nitrocelulosa del DNA fágico presente en las placas de lisis, obtenidas al infectar las células huésped con los fagos de la genoteca, según describen Benton y Davis (16). En la actualidad se han desarrollado métodos más sensibles en la detección de clones recombinantes, por crecimiento de la cepa infectada en el mismo filtro de nitrocelulosa, sin embargo este método no se ha generalizado ya que el posterior aislamiento de los clones se ve dificultado por la realización de réplicas sobre placas de medio rico (18).

Para la selección de los clones recombinantes se procedió a la infección de un cultivo de la cepa de E.coli C600 con una dilución adecuada del lisado fágico y a su crecimiento en placas de LB. Se sembró un total de 15 placas con una densidad de 200 y 400 p.f.u. por placa. Tras realizar las réplicas correspondientes en filtros de nitrocelulosa, según se indica en el apartado 2.13, se procedió a la hibridación con el fragmento BglI de 2,2 kb marcado con ³²P.

Las señales positivas se detectaron mediante la técnica de autorradiografía indirecta descrita en el apartado 2.23. Así fué posible la localización y aislamiento de 25 clones que contenían secuencias homólogas a la sonda radioactiva utilizada.

Durante el tiempo transcurrido hasta el aislamiento de los clones, las placas que contenían las partículas fágicas, se guardaron selladas con parafilm a 4°C.

Seguidamente y con objeto de verificar que los clones aislados contenían el inserto esperado, se procedió a la obtención a pequeña escala del DNA de seis de ellos que se sometió después al tratamiento con la endonucleasa de restricción BamHI. Se comprobó así, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% que todos ellos contenían

un fragmento BamHI de 6,6 kb.

La confirmación de que este fragmento BamHI de 6,6 kb contenía secuencias homólogas a la sonda BglI de 2,2 kb se consiguió mediante su análisis por la técnica de "Southern blot".

Los fragmentos generados por digestión del DNA de los fagos recombinantes con BamHI fueron separados en un gel de agarosa al 0,7% y transferidos a un filtro de nitrocelulosa. Tras hibridar con la sonda BglI de 2,2 kb, se comprobó que la única banda con radioactividad correspondía al inserto genómico de 6,6 kb.

Uno de estos fagos recombinantes al que se denominó lambda prha3, fué utilizado en posteriores estudios.

3.6. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pJB2 POR SUBCLONAJE DEL INSERTO BamHI DEL FAGO LAMBA p_{rha}3 EN EL PLASMIDO pUC18.

Para la construcción del plásmido pJB2 se procedió a digerir una alícuota del DNA del fago recombinante lambda p_{rha}3 con BamHI. Los fragmentos generados fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y se aisló el DNA correspondiente al fragmento, mediante el método de electroelución en papel de DEAE-celulosa (apartado 2.8.1.).

Una alícuota del DNA obtenido fué analizado mediante electroforesis en gel de agarosa con un doble propósito: por una parte, comprobar su pureza y por otra poder cuantificar su concentración que resultó ser de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

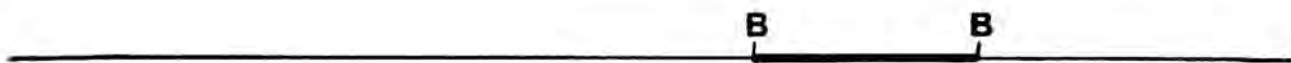
Como vector en el subclonaje de fragmentos genómicos insertados en el fago lambda L47.1 se utilizó el plásmido pUC18, linearizado por digestión con el enzima BamHI.

El subclonaje se llevó a cabo por mezcla de 0,6 μg del fragmento purificado con 0,2 μg del plásmido pUC18, iniciándose la ligación de los mismos por adición de DNA ligasa de T₄ (4 U.) en un volumen de reacción de 20 μl . Las condiciones de ligación fueron las descritas en el apartado 2.14. (fig. 19).

La mezcla de ligación fué utilizada para la transformación de la cepa JM109 que se había hecho competente por el método del Rb/CaCl₂ (apartado 2.15.1.2.). Para ello 10 μl de la mezcla de ligación se utilizaron para transformar 200 μl de suspensión de células competentes. El shock térmico se realizó transfiriendo las células de 0°C a 37°C y se mantuvieron a dicha temperatura durante 5 minutos. Inmediatamente después se adicionaron 0,8 ml de LB y se incubó una hora a 37°C con el fin de que las células transformadas pudieran expresar el gen que codifica para la resistencia a al ampicilina (fig 19). Los clones recombinantes

FIGURA 19. PROCESO DE OBTENCION DEL PLASMIDO
pJB2.

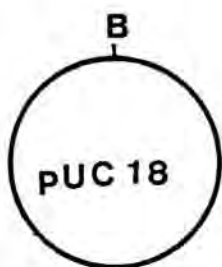
Por razones de orden práctico se utilizan tres escalas diferentes que se muestran por trazos indicadores en cada una de las zonas del esquema.



- 1) Digestión BamHI
- 2) Purificación en gel de agarosa.

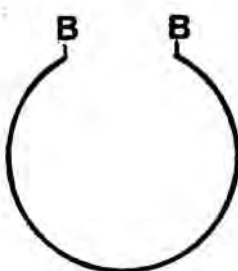


3 Kb



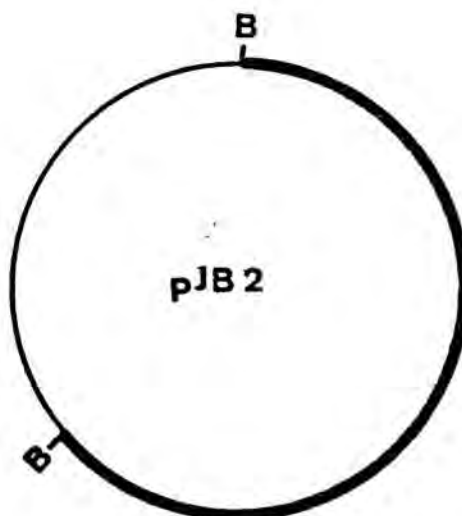
BamHI

0,3Kb



- 1) DNA ligasa de T4
- 2) Transformación de la cepa JM109

1 Kb



se seleccionaron sobre placas de LB conteniendo X-gal, IPTG y ampicilina a las concentraciones indicadas en el apartado 2.14.

Tras incubar a 37°C durante 16 horas se obtuvieron 228 colonias de las cuales 197 fueron azules y por tanto no recombinantes y 31 fueron blancas y correspondían a posibles clones recombinantes. De los 31 posibles clones recombinantes se tomaron 4 al azar para proceder a la preparación de su DNA plasmídico, que fué posteriormente digerido con el enzima BamHI.

Tras analizar los fragmentos obtenidos por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%, uno de los cuatro plásmidos como plásmido a seleccionar por ser el que contenía el fragmento genómico BamHI de 6,6 kb y al que se denominó pJB2.

El plásmido pJB2 fué caracterizado mediante análisis por los enzimas de restricción BamHI, EcoRI y PstI y los datos obtenidos estaban de acuerdo con los correspondientes al plásmido pJB1 y a los análisis genómicos.

3.7. OBTENCION Y ANALISIS DE NUEVOS CLONES CON SECUENCIAS FLANQUEANTES A LAS PREVIAMENTE CLONADAS.

Experimentos de complementación de mutantes puntuales con el plásmido pJB2, permitieron constatar que no se había clonado todo el operón de la ramnosa (ver apartado 3.11). Por este motivo se procedió a clonar un nuevo fragmento de DNA genómico que con toda probabilidad contuviera el resto de los genes del operón rha. Para abordar este objetivo se debía disponer de una nueva sonda que permitiera la localización de nuevas dianas de restricción en el DNA genómico, adyacentes a las previamente caracterizadas, así como la selección de clones recombinantes a partir de una nueva genoteca.

Para la preparación de la sonda se obtuvo DNA del plásmido pJB2, según el método descrito en el apartado 2.16.1.

La digestión de dicho plásmido con las endonucleasas de restricción BamHI y EcoRI generó tres fragmentos de 4,6, 2,6 y 2 kb, de los cuales el de 4,6 kb y el de 2 kb corresponden al DNA clonado.

El fragmento EcoRI-BamHI de 2 kb y que corresponde a la región más distal de la zona clonada fué purificado por el método del CETAB (apartado 2.8.2.). El fragmento fue subsiguientemente marcado radioactivamente con ^{32}P por "Nick translation" según el método descrito en el apartado 2.9. Así se obtuvo una segunda sonda que fué utilizada en una serie de experimentos que se indican a continuación.

Para la localización de nuevas dianas de restricción en el DNA genómico, se procedió a digerir alícuotas de DNA obtenido a partir de cepa 1 con los enzimas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII y PstI.

Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (apartado 2.10.).

A continuación se hibridó con la sonda EcoRI-BamHI de 2 kb y tras revelado autorradiográfico se obtuvo la dis-

tribución de bandas mostrado en la figura 20 . . A partir del tamaño de las bandas de hibridación indicativas de los tamaños de los fragmentos generados en las diferentes digestiones se pudieron localizar una diana EcoRI y otra PstI situadas a 15 kb y 20 kb respectivamente de la diana EcoRI existente en el plásmido pJB2.

La localización de estas dianas permitió la construcción de una nueva genoteca parcial por digestión del DNA de E.coli y del DNA del bacteriófago lambda L47.1 con el enzima EcoRI.

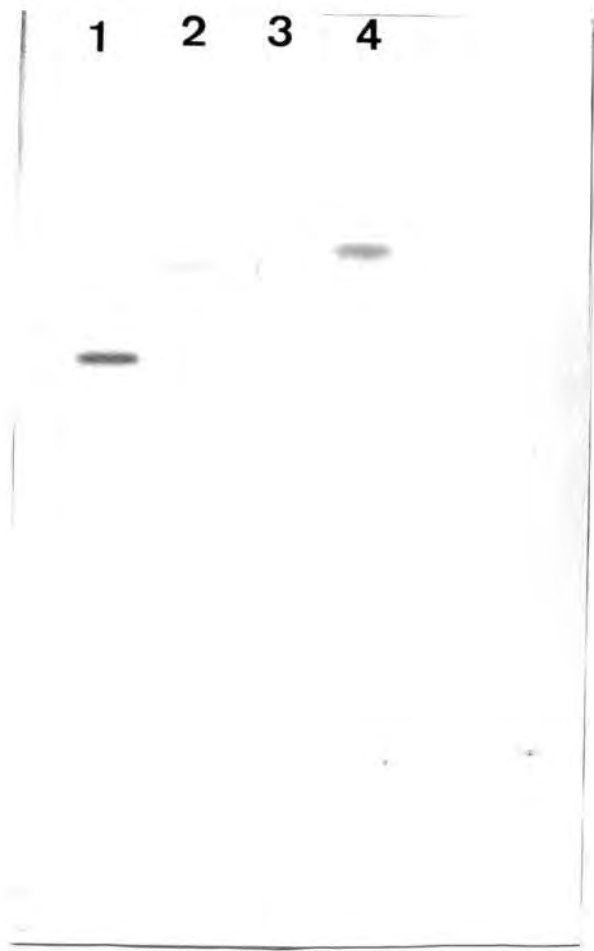
Para ello se procedió a digerir una alícuota del DNA de cepa 1 con EcoRI. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión. Los de tamaño superior a 8 kb fueron purificados por el método del CETAB, según se describe en el apartado 2.8.2. El objeto de esta purificación fué el obtener una genoteca en la que los fagos recombinantes hubieran incorporado un único fragmento del DNA genómico ya que la unión de dos de ellos, con una alta probabilidad, superaría la capacidad de empaquetamiento del vector que resulta ser de aproximadamente 18 kb.

Paralelamente se procedió a digerir una alícuota del DNA del fago lambda L47.1 con el enzima EcoRI. La digestión del DNA del bacteriófago lambda L47.1 con este enzima genera tres fragmentos de: 21,7 , 11,3 y 7,6 kb respectivamente. Los fragmentos de 21,7 y 7,6 kb son los denominados brazos del vector y son esenciales para el ciclo lítico del fago, mientras que el de 11,3 kb puede ser sustituido por DNA foráneo.

Así, después de separar los brazos del vector por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,7%, se procedió a purificar los brazos del vector por el método del CETAB (apartado 2.8.2.). Debido a que la preparación obtenida presentaba contaminación con el fragmento de 11,3 kb, que en el desarrollo electroforético quedaba localizado entre los 2 brazos del vector, se proce-

FIGURA 20. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS GENOMICOS DE E.COLI HOMOLOGOS AL FRAGMENTO EcoRI BamHI de 2 Kb UTILIZADO COMO SONDA.

La imagen muestra las bandas de hibridación de la sonda de 2 Kb con los fragmentos generados tras digestión del DNA separación electroforética y transferencia a papel de nitrocelulosa; utilizando para la restricción los enzimas BamHI (1), EcoRI (2), PstI (3) y HindIII (4).



dió a un nuevo proceso de purificación; esta vez mediante la utilización de técnicas de electroelución en papel de DEAE-celulosa (apartado 2.8.1.).

Para la construcción de la genoteca se mezclaron $1,5 \mu\text{g}$ de los brazos del vector con $0,75 \mu\text{g}$ de los fragmentos genómicos, que fueron ligados covalentemente en un volumen de $20 \mu\text{l}$ con DNA ligasa de T_4 (4 U.) según las condiciones detalladas en apartado 2.14.

Seguidamente las moléculas de DNA recombinantes fueron empaquetados in vitro (apartado 2.12.1.) obteniéndose a partir de los $20 \mu\text{l}$ de mezcla de ligación y en nuestras condiciones, un rendimiento de 5500 p.f.u.

El aislamiento de los clones se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.5., con la única diferencia de que la sonda radioactiva utilizada en este caso fué el fragmento Eco RI-BamHI de 2 kb obtenido a partir del plásmido pJB2.

Se identificaron más de 100 clones que contenían secuencias homólogas a la sonda utilizada. De ellos se seleccionaron cuatro al azar y se procedió a la obtención de su DNA (ver apartado 2.6.4.) y a la digestión del mismo con el enzima EcoRI. Se separaron los fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y se evidenció en todos ellos la presencia de un fragmento de 15 kb. De entre todos ellos se seleccionó uno al que se denominó lambdap ρ ha4.

Seguidamente se preparó a gran escala el DNA del fago lambda p ρ ha4 y se procedió al subclonaje del inserto EcoRI de 15kb en el plásmido pUC18. Para ello una alícuota del DNA del fago se digirió con EcoRI y el inserto de 15 kb fué purificado por el método del CETAB (apartado 2.8.2.). Paralelamente una alícuota del DNA del plásmido pUC18 fué también digerido con EcoRI.

La ligación se realizó en las condiciones detalladas en el apartado 2.14. por adición de DNA ligasa de T_4 (4 U.) a una mezcla de reacción ($20 \mu\text{l}$) que contenía $0,2 \mu\text{g}$ de plásmido y $1 \mu\text{g}$ del DNA del fragmento de 15 kb.

Células competentes de la cepa JM109, preparadas según el método del Rb/CaCl₂ (apartado 2.15.1.2.), se transformaron con 10 μ l de la mezcla de ligación. Los transformantes fueron seleccionados sobre placas de LB, ampicilina, X-gal e IPTG. Se obtuvieron 160 transformantes de los cuales sólo 14 eran capaces de expresar en presencia de inductor el gen de la β -galactosidasa. Se escogieron 4 de ellos al azar, de los cuales se obtuvo DNA plasmídico a pequeña escala (apartado 2.16.2.) y se procedió a la digestión de los mismos con la endonucleasa de restricción EcoRI. Del análisis de los fragmentos generados se identificó un clon que poseía el inserto de 15 kb, y al que se denominó pJB3 y que fué utilizado en posteriores estudios.

3.8. CONSTRUCCION DE UNA COLECCION DE PLASMIDOS CONTE- NIENDO SECUENCIAS QUE ABARCAN LA TOTALIDAD DE LA REGION CLONADA.

Antes de proceder a la obtención de nuevos plásmidos se realizó un estudio detallado de los plásmidos pJB2 y pJB3 con el fin de poder conocer la orientación de los fragmentos genómicos clonados con respecto al resto de dianas presentes en el "polylinker" del plásmido pUC18.

Como ya se ha descrito con anterioridad, el plásmido pJB2 se caracteriza por poseer un fragmento genómico de E.coli BamHI de 6,6 kb. Dentro de este fragmento se había identificado la presencia de una única diana EcoRI en una posición que divide al inserto en dos fragmentos distintos y que se ha utilizado como punto de referencia para orientar dicho fragmento en el plásmido recombinante pJB2.

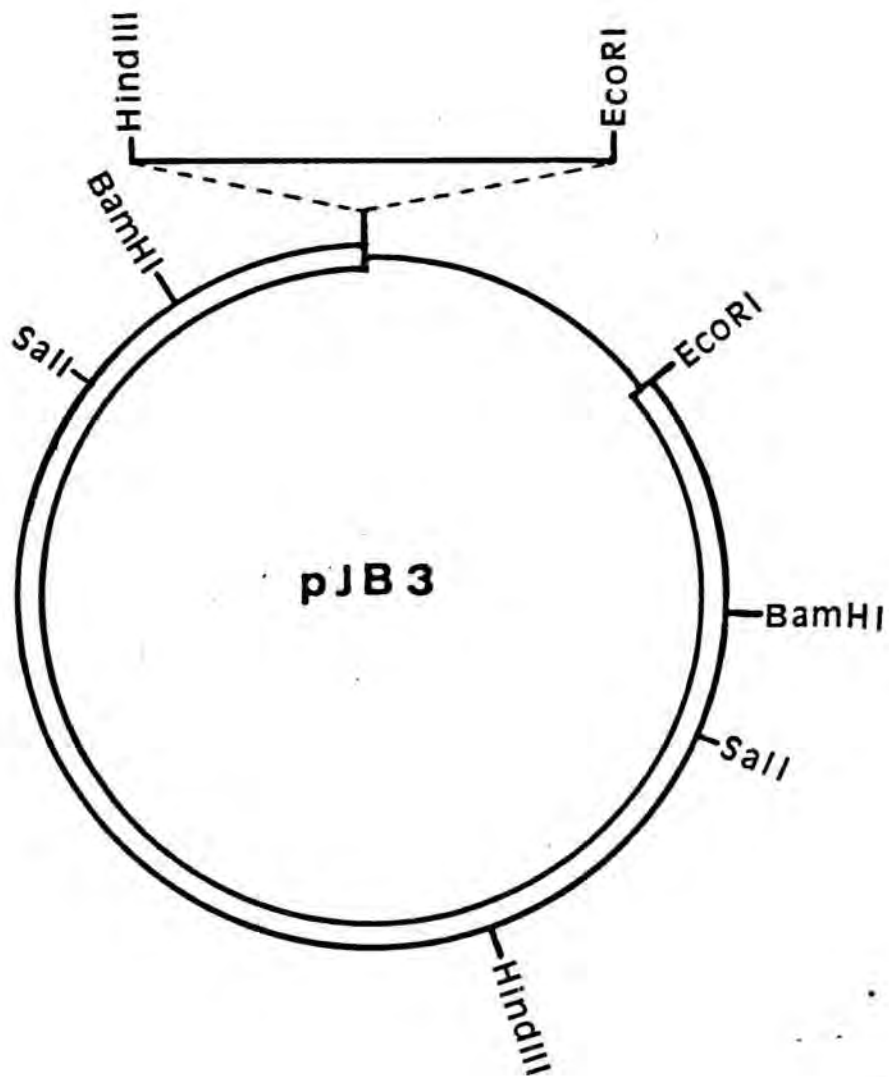
Tras digerir una alícuota del plásmido pJB2 con el enzima EcoRI y separar los fragmentos generados por electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, se observaron dos fragmentos de un tamaño molecular de 7,2 y 2 kb respectivamente. El tamaño de estos fragmentos sólo es compatible con la orientación del fragmento clonado tal y como se indica en la figura 21.

Así mismo, se procedió a estudiar el plásmido pJB3 que posee insertado un fragmento del genoma de E.coli de 15 kb dentro del "polylinker" del plásmido pUC18 y cuyo aislamiento se describe en el apartado 3.7. Para determinar la orientación relativa del inserto dentro del vector fué de gran utilidad la detección de nuevas dianas de restricción en el fragmento clonado. La localización de estas dianas fué posible a partir de los datos obtenidos tras digerir el plásmido recombinante pJB3 con los siguientes enzimas de restricción:

- 1) SalI
- 2) EcoRI
- 3) HindIII

FIGURA 21. MAPA FISICO DEL PLASMIDO pJB3.

El esquema muestra en mapa de restricción del plásmido, en trazo fino, y del fragmento genómico, en trazo grueso. Las zonas correspondientes al "polilinker", se muestran ampliadas fuera del círculo.



- 4) BamHI
- 5) SalI-HindIII
- 6) HindIII-EcoRI
- 7) SalI-BamHI
- 8) BamHI-EcoRI
- 9) BamHI-HindIII

En la figura 21 se muestra el mapa de restricción del inserto del plásmido pJB3 para los enzimas EcoRI, HindIII y SalI, así como la orientación de dicho inserto con respecto al vector.

La obtención del plásmido pJB2.1 a partir del plásmido pJB2 fué posible gracias a la presencia de dos dianas EcoRI, una perteneciente al "polylinker" del vector y otra dentro del fragmento clonado (figura 22). Ello permitió la eliminación de un fragmento de 2 kb por digestión del plásmido pJB2 con EcoRI y posterior recircularización del fragmento de 7,2 kb resultante.

Para ello se procedió a digerir una alícuota del plásmido pJB2 con el enzima EcoRI. Una alícuota del mismo, conteniendo 90 ng del DNA digerido, fué incubado en presencia de tampón de ligación (apartado 2.14.) y de DNA ligasa de T_4 (2 U.) y en un volumen final de 20 μ l.

10 μ l de la mezcla de ligación se utilizó para la transformación de una suspensión de células competentes de la cepa JM109. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB-Amp y a continuación se procedió a la obtención de DNA plasmídico (apartado 2.16.2.) de seis de los transformantes tomados al azar y posterior digestión de los mismos con el enzima EcoRI. Todos los transformantes analizados resultaron ser plásmidos recombinantes que habían perdido el fragmento EcoRI de 2 kb. Uno de estos recombinantes, al que se denominó pJB2.1, fué utilizado en estudios posteriores.

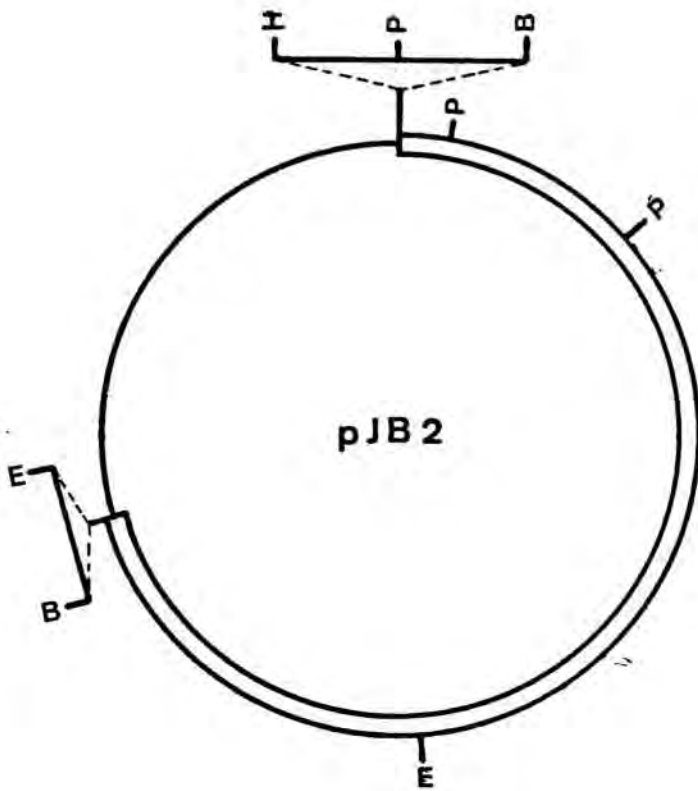
El plásmido pJB3 se utilizó para preparar una serie de nuevos plásmidos conteniendo distintas secuencias del fragmento genómico EcoRI de 15 kb (figura 23). Uno de ellos,

FIGURA 22. ESQUEMA DE LA CONSTRUCCION DEL PLASMI-
DO pJB2.1

La figura muestra el proceso de diges-
tión y ligación que genera el plásmido
pJB2.1 a partir del plásmido pJB2.

La figura muestra los mapas de restric-
ción de los plásmidos recombinantes
pJB2 y pJB2.1.

Los fragmentos de DNA del plásmido se
representan en trazo fino, y los del
DNA genómico, en trazo grueso. Las zo-
nas correspondientes al "polilinker"
se muestran ampliadas fueradel circulo.
B corresponde a una diana BamHI, E a
EcoRI, H a HindIII y P a PstI



1) Digestión EcoRI
2) DNA ligasa de T4

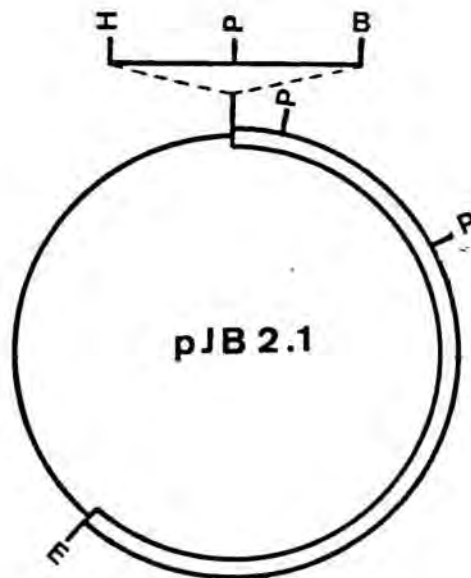
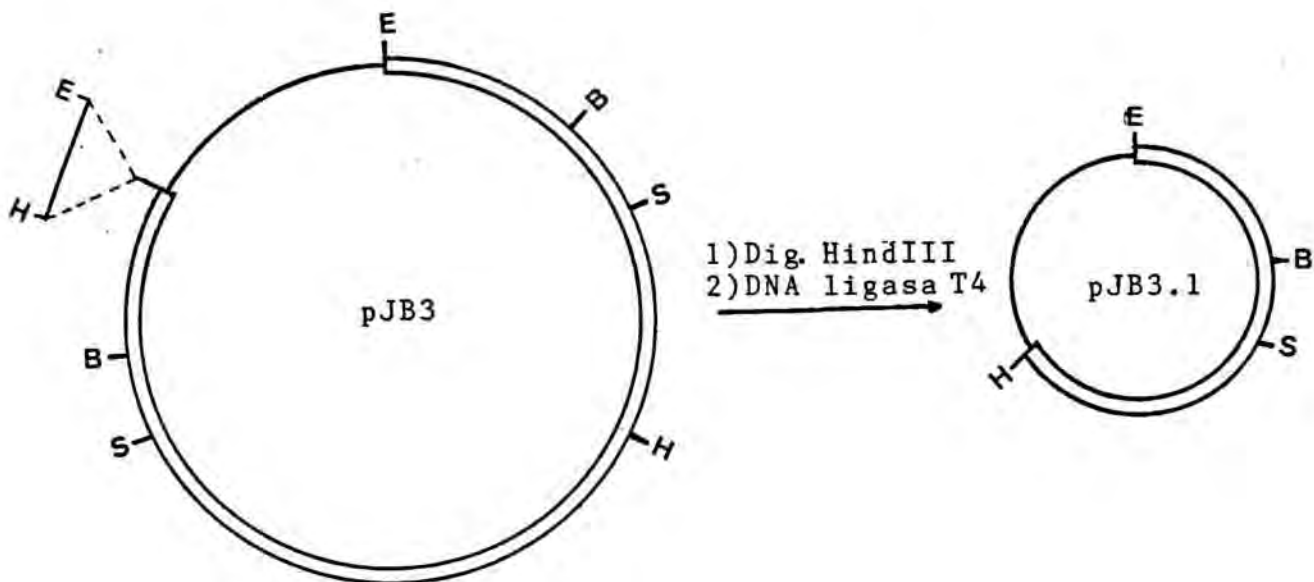
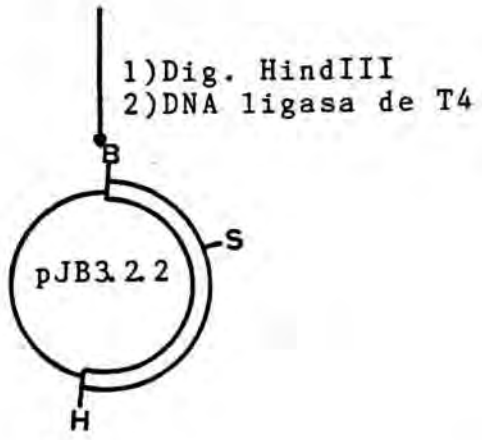
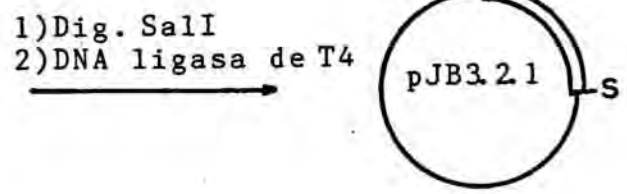
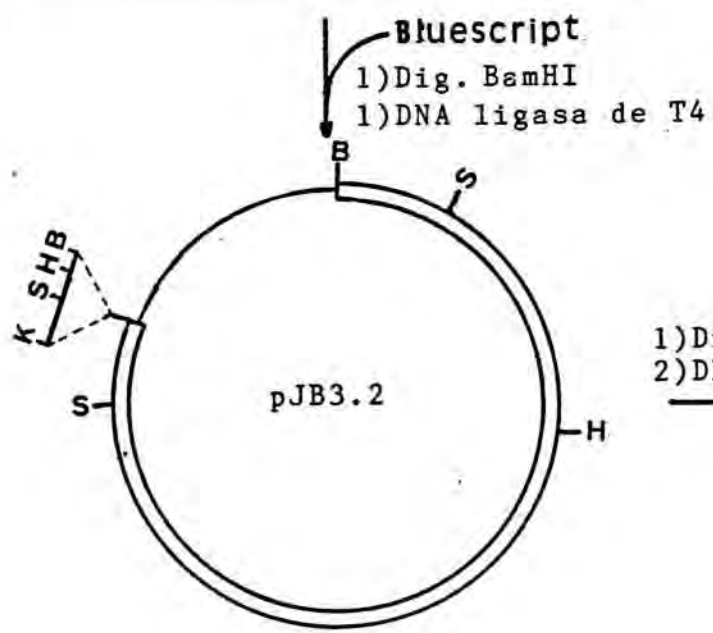
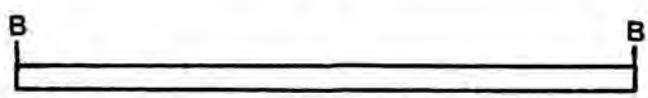


FIGURA 23. OBTENCION A PARTIR DEL PLASMIDO PJB3, DE LOS PLASMIDOS pJB3.1 DE LOS PLASMIDOS pJB3.1, pJB3.2, pJB3.2.2 y pJB3.2.1.

El esquema muestra los mapas de restricción del plasmido pJB3 y sus derivados. B corresponde a una diana BamHI, E a EcoRI, H a HindIII y S a Sall. Así mismo, se detalla el proceso de digestión, purificación y ligación de los distintos fragmentos para la construcción de los plásmidos que se indican. Con doble trazo, se representa el DNA perteneciente al genoma de E.coli y con trazo simple el DNA perteneciente al plasmido.



1) Dig. BamHI
2) Purif. en gel de agarosa.



1Kb

al que se denominó pJB3.1, se obtuvo tras digerir el plásmido pJB3 con el enzima HindIII y posterior recircularización del mismo. La estrategia seguida es similar a la seguida para la obtención del plásmido pJB2.1 y que ha sido detallada anteriormente en este mismo apartado.

Otro subclón derivado del plásmido pJB3 es el pJB3.2 que contiene el fragmento BamHI de 11,4 kb presente en el inserto genómico de 15 kb (figura 23).

Para la construcción del plásmido pJB3.2 se procedió a la digestión de una alícuota del plásmido pJB3 con BamHI y los fragmentos obtenidos de 1,6 , 4,6 y 11,4 kb fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y el fragmento de 11,4 kb fué purificado mediante electroelución en papel de DEAE-celulosa (apartado 2.8.1.). A continuación 0,5 g del DNA del fragmento BamHI de 11,4 kb fué mezclado con 0,15 g del plásmido "Bluescript", también digerido con BamHI, siendo incubados en presencia de DNA ligasa de T_4 (2 U.), en un volumen final de 20 μ l y en las condiciones descritas en el apartado 2.14. Una alícuota de 10 μ l de la mezcla de ligación se utilizó para transformar una suspensión de células competentes de la cepa JM109 y los transformantes fueron seleccionados por incubación a 37°C sobre placas de LB, ampicilina, X-gal e IPTG. De los 422 transformantes obtenidos 47 correspondían a colonias blancas, de las cuales se analizaron ocho seleccionadas al azar. Tras preparar el DNA de estos clones a pequeña escala (apartado 2.16.2.) se procedió a su digestión con el enzima BamHI y se comprobó que sólo uno de ellos contenía el inserto de 11,4 kb. Este clon, al que denominamos pJB3.2 fué utilizado para posteriores estudios.

El estudio del plásmido pJB3.2 con las endonucleasas de restricción SalI y HindIII permitió conocer la orientación del fragmento clonado con respecto a las dianas del "poly-linker" del vector. Con esta información se procedió a la construcción de dos nuevos plásmidos derivados del plásmido pJB3.2. Uno de ellos, al que denominamos pJB3.2.1, se

obtuvo tras digestión del plásmido pJB3.2 con SallI y posterior recircularización del DNA resultante con DNA ligasa de T_4 . El otro, denominado pJB3.2.2, se obtuvo por eliminación de un fragmento HindIII de 9,7 kb tras digerir el plásmido pJB3.2 con el enzima HindIII y posterior recircularización con DNA ligasa de T_4 .

En ambos casos se siguió la metodología descrita en este mismo apartado para la construcción del plásmido pJB2.1.

Experimentos de complementación de mutantes puntuales Rha^- con los diferentes plásmidos recombinantes obtenidos permitieron acotar la región del genoma que codificaba para los diferentes enzimas que intervienen en el metabolismo de la ramnosa. Los resultados obtenidos pusieron claramente de manifiesto que ninguno de los plásmidos estudiados contenía la información necesaria para completar la totalidad de los mutantes puntuales Rha^- . (Para el análisis de complementación ver apartado 3.9.). Consecuentemente se procedió a la construcción de un nuevo plásmido recombinante que fuera capaz de complementar la totalidad de dichos mutantes. La construcción de dicho plásmido, al que denominamos pJB4, se realizó de acuerdo con el esquema que se indica en la figura 24. Para ello se procedió a digerir una alícuota del plásmido pJB2 con los enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Esta digestión generó tres fragmentos de 4,6 , 2,6 y 2 kb respectivamente. El fragmento de 4,6 kb fué purificado mediante electroelución en papel de DEAE-celulosa (apartado 2.8.1.) para su posterior utilización.

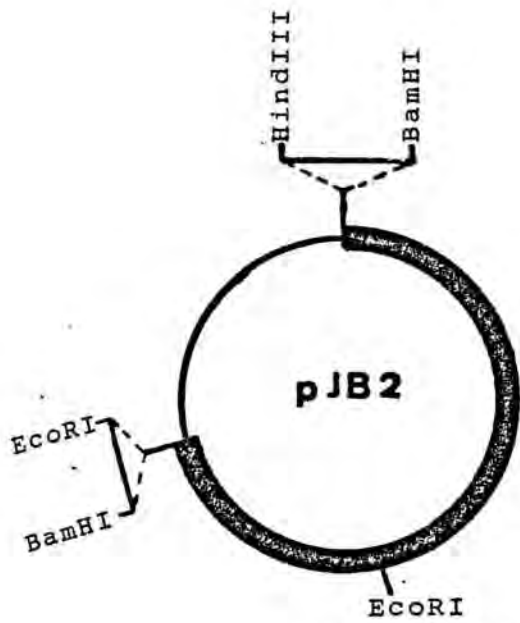
Paralelamente se procedió a digerir una alícuota del plásmido pJB3.1 con los enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Se generaron dos fragmentos de 5,3 y 2,6 kb respectivamente, de los cuales el de 5,3 kb fué igualmente purificado para su posterior utilización.

A continuación 90 ng del fragmento BamHI-EcoRI derivado del plásmido pJB2 fueron mezclados con 100 ng del fragmento EcoRI-HindIII, derivado del plásmido pJB3.1, y uni-

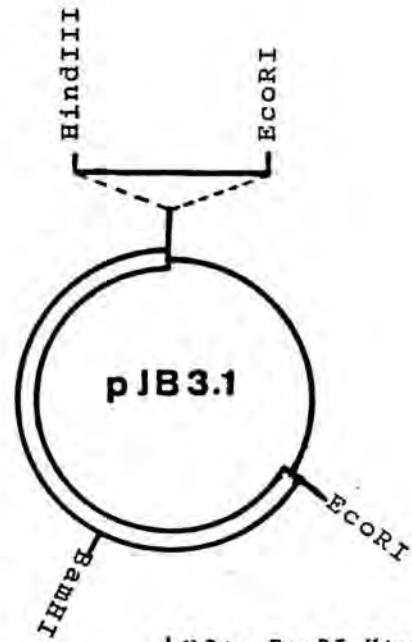
FIGURA 24. OBTENCION, A PARTIR DE LOS PLASMIDOS pJB2 Y pJB3.1, DEL PLASMIDO pJB4.

El esquema muestra el mapa de restricción de los plasmidos pJB2, pJB3.1 y pJB4. Así mismo, detalla el proceso de digestión, purificación y ligación de los distintos fragmentos para la construcción del plásmido pJB4 que contiene todo el operón rha.

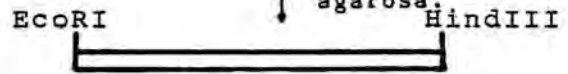
El DNA genómico se representa por trazo lleno cuando el fragmento pertenece al plásmido pJB2 y por doble trazo vacío cuando pertenece al plásmido pJB3.1. El DNA del plasmido se representa por trazo simple.



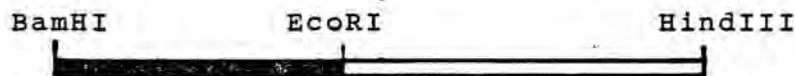
1) Dig. BamHI-EcoRI
 2) Purif. en gel de agarosa



1) Dig. EcoRI-HindIII
 2) Purif. en gel de agarosa



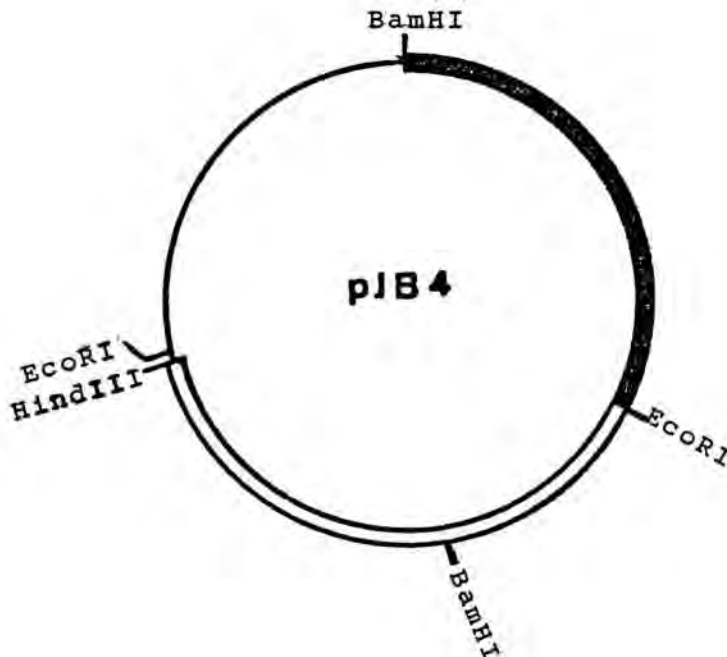
DNA ligasa de T4



pBR322

1) Dig. BamHI-HindIII
 2) Purif. en gel de agarosa.

DNA ligasa de T4



dos covalentemente por adición de DNA ligasa de T_4 (2 U.) y en condiciones de ligación detalladas en el apartado 2.14.

Una vez realizada la ligación de los fragmentos genómicos, una alícuota de 10 μ l de esa mezcla de ligación fué adicionada de 50 ng de pBR322 digerido con BamHI-HindIII y se incubó en un volumen final de 20 μ l en presencia de DNA ligasa de T_4 (2 U.). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB-Amp. La recircularización del vector sobre si mismo no era posible como consecuencia de no poseer extremos complementarios, se trataba pues de un proceso de ligación digerido en la que los plásmidos obtenidos sólo podían ser dímeros del pBR322 o bien del plásmido recombinante deseado.

Se obtuvieron 28 transformantes de los cuales se analizaron, por digestión simultanea del DNA plasmídico con los enzimas EcoRI y HindIII, siendo todos ellos plásmidos recombinantes que poseían un inserto BamHI-HindIII de 10 kb. Se seleccionó uno de ellos al que se denominó pJB4.

Por último se procedió, a partir del plásmido pJB4, a la obtención de dos nuevos plásmidos denominados pJB4.1 y pJB4.2 (figura 25).

Los plásmidos pJB4.1 y pJB4.2 se obtuvieron por subclonaje de los fragmentos generados por digestión del plásmido pJB4 con los enzimas de restricción SalI y PstI en los vectores de clonaje pUC18 y "Bluescript" respectivamente.

El procedimiento seguido en este caso fué el mismo que el utilizado en la obtención del plásmido pJB3.2 y que ha sido detallado con anterioridad en este mismo apartado.

En la figura 26 se muestran los distintos fragmentos de DNA genómico que cubren total o parcialmente los genes del operón de la rha. Todos ellos se hallan insertados en plásmidos, y como puede observarse, se corresponden con regiones varias del citado operón rha.

FIGURA 25. OBTENCION, A PARTIR DEL PLASMIDO pJB4, DE LOS PLASMIDOS pJB4.2 Y pJB4.1.

El esquema muestra los mapas de restricción del plásmido pJB4 y sus derivados. B corresponde a una diana BamHI, E a EcoRI, H a HindIII, P a PstI y S a SalI. Así mismo, se detallan el proceso de digestión, purificación y ligación de los distintos fragmentos para la construcción de los plásmidos que se indican. Con doble trazo, se representa el DNA perteneciente al genoma de E.coli y con trazo simple el DNA perteneciente al plásmido.

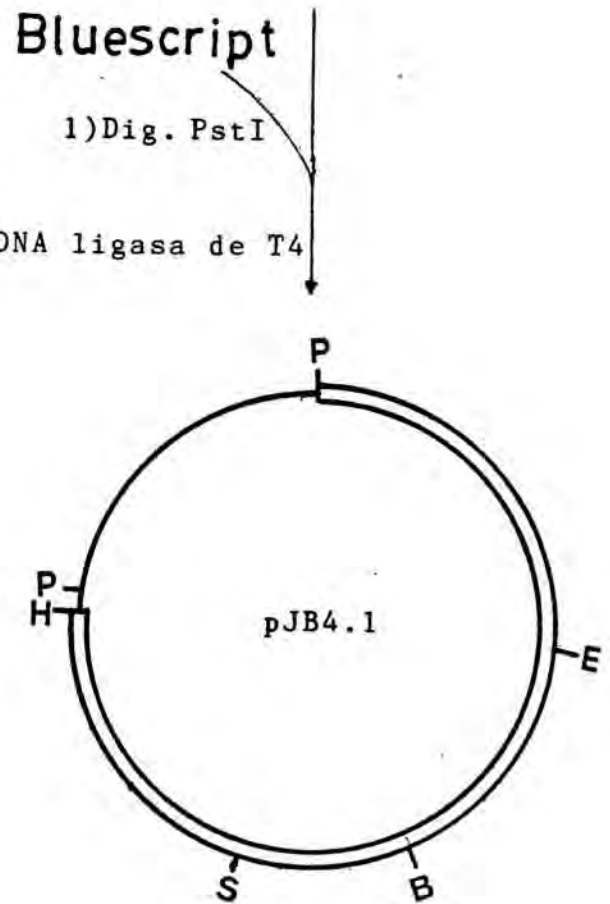
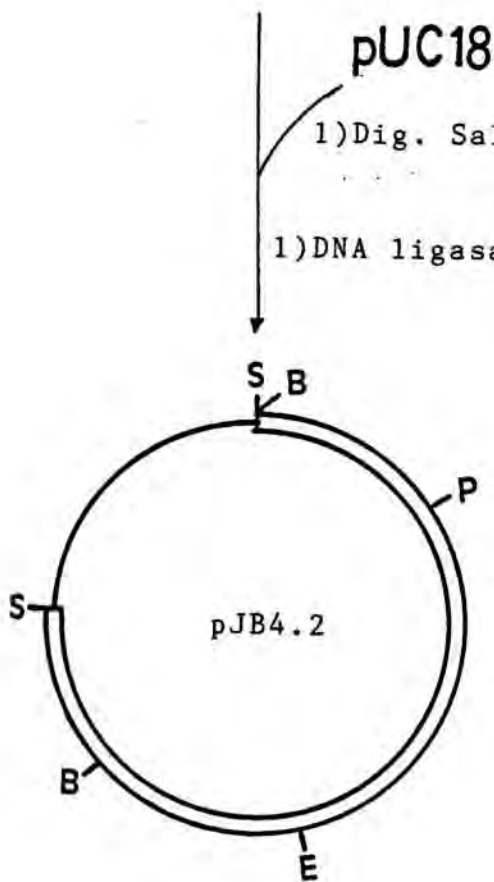
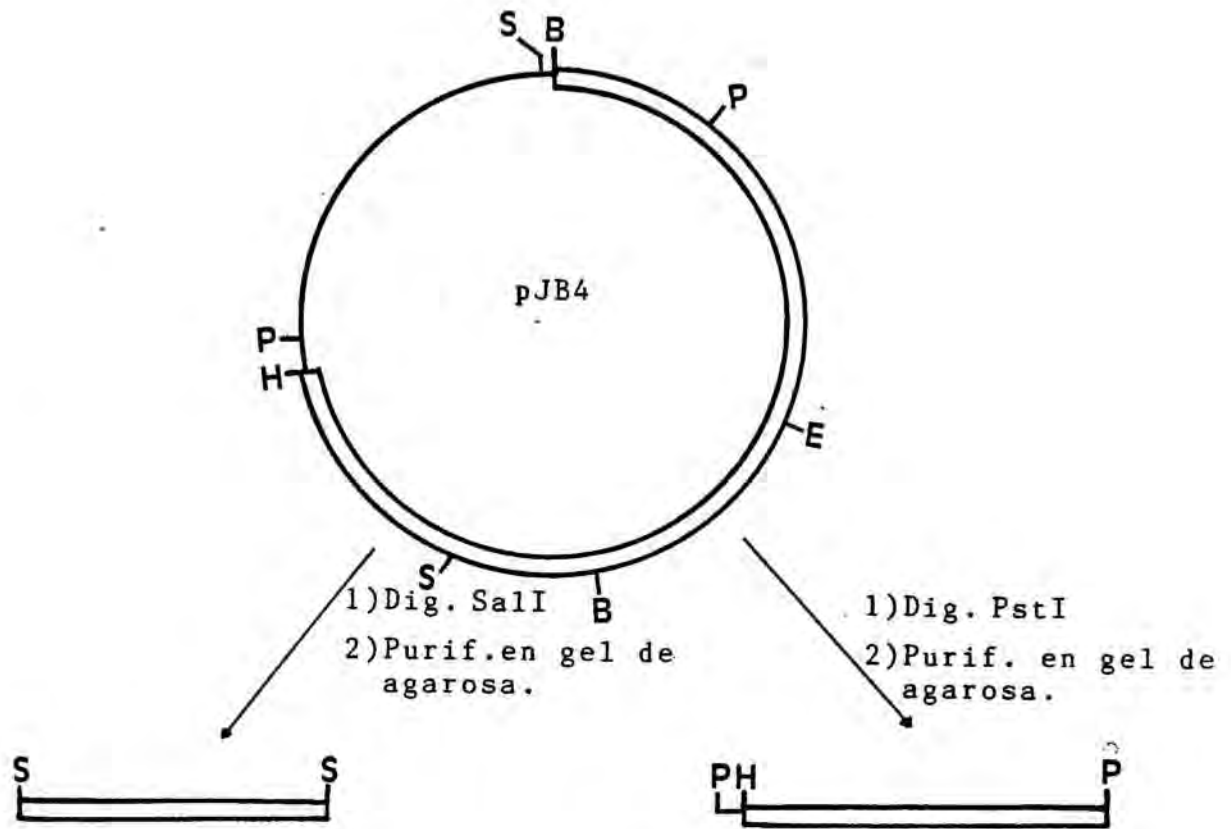
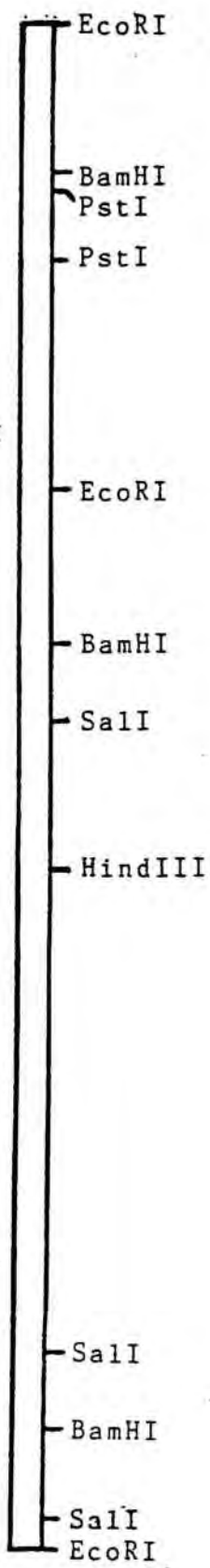


FIGURA 26. CONJUNTO DE PLASMIDOS RECOMBINANTES OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO.

La figura muestra el mapa de restricción del fragmento clonado, con la disposición relativa de los diferentes fragmentos genómicos generados en la construcción del conjunto de plásmidos que cubren la totalidad o fracciones del locus rha.



rhaC rhaB rhaA rhaD



pJB1



pJB2



pJB2.1



pJB3



pJB3.2



pJB3.1



pJB3.2.2



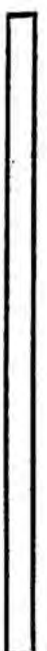
pJB3.2.1



pJB4



pJB4.2



pJB4.1



3.9 COMPLEMENTACION DE MUTANTES PUNTUALES EN EL OPERON rha CON LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES

Estudios de complementación de mutantes puntuales con los plásmidos recombinantes obtenidos, han permitido establecer la localización relativa de los genes dentro del fragmento genómico clonado.

Así se han utilizado diversos mutantes: la cepa denominada Frag 1, que se caracteriza por poseer una mutación en el gen rha C (que codifica para los elementos de control) o en el gen rha A (que codifica para el enzima L-ramnosa isomerasa, se trata de un mutante de E.coli incapaz de crecer en ramnosa como única fuente de carbono y energía, si bien la presencia de la misma en otros medios de cultivo no afecta el crecimiento de dicha cepa.

Otro mutante utilizado es la cepa AT 753, cuya mutación afecta al gen de la quinasa (rha B), si bien parece tratarse en este caso de un mutante polar puesto que posee niveles de actividad isomerasa muy bajos, con lo que se produce una menor síntesis de L-ramnulosa (metabolito formado a partir de ramnosa, por acción de la ramnosa isomerasa). Lo que por otra parte concuerda con una excreción de ramnulosa menor de lo que cabría esperar en un mutante defectivo en ramnulosa kinasa.

Otro de los mutantes de E.coli utilizado, ha sido la cepa Rha D 62 que presenta una mutación en el gen rha D que codifica la síntesis del enzima ramnulosa-1-fosfato aldolasa. Este mutante no sólo es incapaz de crecer en ramnosa como única fuente de carbono y energía, sino que está descrito que los mutantes en el gen rha D, cuando crecen en otro medio de cultivo en presencia de ramnosa se intoxican por la acumulación de ramnulosa-1-fosfato, no detectandose practicamente crecimiento. (117)

Así mismo, se utilizó la cepa DF903 que se caracteriza por poseer una delección que va desde pfkA a rha. Por tanto no puede crecer en ramnosa cuando esta se utiliza

TABLA 6

COMPLEMENTACION DE MUTANTES Rha⁻

| Plásmidos utilizados | Cepas transformadas | | | |
|----------------------|---------------------|-------|-------|-------|
| | Frag1 | AT753 | RaD62 | DF903 |
| pJB2 | + | + | - | - |
| pJB2.1 | ++ | ++ | - | N.E |
| pJB3 | - | - | ++ | - |
| pJB3.1 | - | - | + | N.E |
| pJB3.2 | - | - | + | N.E |
| pJB3.2.1 | - | - | - | N.E |
| pJB3.2.2 | - | - | + | N.E |
| pJB4 | ++ | ++ | ++ | - |
| pJB4.1 | ++ | ++ | ++ | N.E |
| pJB4.2 | + | + | - | N.E |

++ indica un crecimiento homogéneo en 48 horas.+ indica un crecimiento pobre en 48 horas y

- indica la ausencia de crecimiento después de 72 horas de incubación.N.E indica no ensayada.

como única fuente de carbono, sin embargo no se ve afectado su crecimiento por la presencia de ramnosa cuando crece en otras fuentes de carbono.

Para proceder a estudios de complementación de los mutantes Rha^- fué necesario la transformación de las diferentes cepas citadas en este apartado con cada uno de los plásmidos recombinantes que queríamos estudiar, según la metodología descrita en el apartado 2.15.1.2

Los transformantes obtenidos fueron estudiados por su capacidad de crecer en ramnosa como única fuente de carbono y energía. Así se procedió a sembrar 6 clones independientes procedentes de cada transformación, en placas de LB-Amp. Se incubaron durante 5 -6 horas a 37°C y después se procedió a realizar replicas en placas de ramnosa, glucosa y LB-Amp. Estas placas fueron más tarde incubadas a 37°C hasta un máximo de tres días. Cabe mencionar que las placas de ramnosa y glucosa fueron suplementadas con los requerimientos nutricionales inherentes a cada cepa.

En la tabla 6 , se detallan los plásmidos recombinantes y los mutantes Rha^- utilizados, así como los resultados obtenidos en la complementación de dichos mutantes con cada uno de los plásmidos utilizados. Puede observarse como los plásmidos pJB2 y pJB2.1 complementan las cepas Frag1 y AT753; incomprensiblemente pJB2.1 complementa mejor que pJB2. Por otra parte, pJB3, pJB3.1. pJB3.2 y pJB3.2.2 complementan la cepa rhaD62. Por otra parte el plásmido pJB4, obtenido a partir de pJB3 y pJB2.1 complementa todos los mutantes puntuales Rha^- ensayados.

La utilización de plásmidos conteniendo subfragmentos de los anteriores permite acotar mejor la distribución y orden de los genes como se verá en el apartado de discusión. Ninguno de los plásmidos obtenidos es capaz de complementar la cepa DF903 que presenta una delección desde rha hasta pfkA.

3.10 EXPRESION DE PLASMIDOS RECOMBINANTES EN MAXICELULAS

En este apartado se aborda el estudio molecular de los productos de expresión de los plasmidos recombinantes pJB2.1, pJB3.1, pJB4.2, así como el del plasmido pUC18.

Normalmente cuando se ha clonado un fragmento de DNA en vectores fágicos o plasmídicos, interesa estudiar los productos proteicos que son codificados por dicho DNA. Para ello se han utilizado numerosas técnicas como son :inmunoprecipitación de productos de expresión de plasmidos en minicelulas o maxicélulas (47,146), infección de células irradiadas con luz U. V, con fagos (146), expresión selectiva de genes plasmídicos por tratamiento con cloranfenicol (109), etc.

Para estudiar los productos de expresión de los plasmidos recombinantes pJB2, pJB3.1 y pJB4.2 se ha utilizado la técnica de maxicélulas por dos motivos, uno por su gran simplicidad y otro porque es mucho más segura y produce resultados más fiables que otros métodos utilizados para la expresión de plásmidos.

Las maxicélulas son mutantes de E.coli que han sufrido la degradación de su DNA cromosómico por tratamiento con pequeñas dosis de irradiación de luz U.V, mientras que las moléculas plasmídicas sobreviven en su citoplasma.

Para la obtención de maxicélulas, se utilizan mutantes de E.coli uvr, recA, phr o bien mutantes que sólo contenían la mutación recA por ser sensibles a la irradiación con luz U.V. Los mutantes uvr, recA, phr necesitan una menor dosis de irradiación para la degradación de su DNA y una vez irradiadas, no pueden reparar el daño sufrido en su DNA por procesos de fotoreactivación, como sucede en los mutantes recA. Sin embargo, debido a que poseen un tiempo de duplicación excesivamente largo y son difíciles de mantener viables, se eligió para su utilización en la expresión de los plasmidos recombinantes pJB2, pJB3.1, pJB4.2 y pUC18 la cepa C600recA. Para ello se procedió a transformar una suspensión de células competentes de la cepa C600recA con una alícuota de ca-

da uno de los plásmidos anteriormente citados. Los transformantes, seleccionados por crecimiento en placas de LB-Amp, se utilizaron para el estudio de los productos de expresión, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.18.

La irradiación se realizó mediante la utilización de una lámpara de luz U.V de 254 nm situada a 50 cm de altura de la superficie a irradiar y con una potencia de 15 vatios. Para cuantificar los minutos que era necesario irradiar el cultivo de células que contenían el plásmido, se procedió a un experimento piloto, en el que se hizo crecer la cepa C600recA en las condiciones que se describen en el apartado 2.18, hasta una absorbancia de 0,5 a 450 nm. Seguidamente, 12 ml del cultivo se transfirieron esterilmente a una placa petri y se procedió a su irradiación separando alícuotas de 1 ml del mismo a diferentes tiempos de irradiación.

Se procedió después, a recoger las células por centrifugación, se lavaron con SM y se resuspendieron en 0,5 ml de un medio mínimo sin sulfato, adicionando 50 μg de fosfomicina. Más tarde, se adicionaron 3 μl de la mezcla de aminoácidos detallada en el apartado 2.18 y se incubó a 37°C durante 1 hora, al cabo de la cual se adicionaron 25 μCi de ^{35}S - metionina, volviéndose a incubar 1 hora a 37°C. Posteriormente se llevó la metionina a una concentración final 160 mM y se incubaron 5 minutos a 37°C. Se procedió a filtrar las diferentes alícuotas, que contenían células en suspensión irradiadas a distintos tiempos, a través de filtros Millipore de 0,45 μm . Se lavaron los filtros con 5 ml de SM y se introdujeron en viales a los que posteriormente se adicionó 10 ml de la solución de Bray () preparada según se detalla en el apartado 2.18 y se procedió a determinar el número de cuentas incorporadas por los 0,5 ml de cada alícuota de suspensión celular. Así se pudo observar que después de 2 minutos y 30 segundos de irradiación no se incorporaba prácticamente radioactividad y que ésta era la misma incluso después de irra-

diar 10 minutos (figura 27). Por eso, el tiempo de irradiación en las condiciones anteriormente citadas, fué en todos los casos de 2 minutos 30 segundos. Los productos expresados fueron marcados con ^{35}S y sometidos a su separación mediante técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida SDS al 10% (apartado 2.17.2).

Después de someter el gel a técnicas fluorográficas (apartado 2.20), se pudo detectar el patrón de bandas que se muestran en la figura 28 y 29. El tamaño molecular de las mismas pudo determinarse mediante la utilización de marcadores de peso molecular conocido y que fueron desarrollados paralelamente en el gel de electroforesis con las muestras analizadas.

En la tabla 7 se detalla el número y tamaño de los polipeptidos detectados en la expresión génica de los diferentes plásmidos en presencia y ausencia de ramnosa.

El plásmido pJB2.1 en ausencia de inductor, produjo la expresión de dos proteínas de 24.000 y 29.000 daltons y en presencia de inductor, sorprendentemente, sólo produjo la expresión de la proteína de 24.000 daltons. El plásmido pJB3.1 expresa constitutivamente, además de las proteínas características del pUC18, cuatro proteínas de peso molecular 33.000, 53.000, 61.000 y 62.000 daltons respectivamente.

El plásmido pJB4.2 expresa en ausencia de inductor, tres proteínas de 24.000, 29.000 y 34.000 daltons, y en presencia de inductor expresa además de la de 24.000, otra de 53.000 daltons, por lo que en este plásmido la expresión se ve modificada por la presencia de ramnosa en el medio de cultivo.

FIGURA 27. CINETICA DE INCORPORACION DE ^{35}S -METIONINA EN CELULAS C600 recA IRRADIADAS CON LUZ ULTRAVIOLETA.

Se muestra la incorporación de ^{35}S -metionina en función del tiempo de irradiación en las condiciones descritas en el texto.

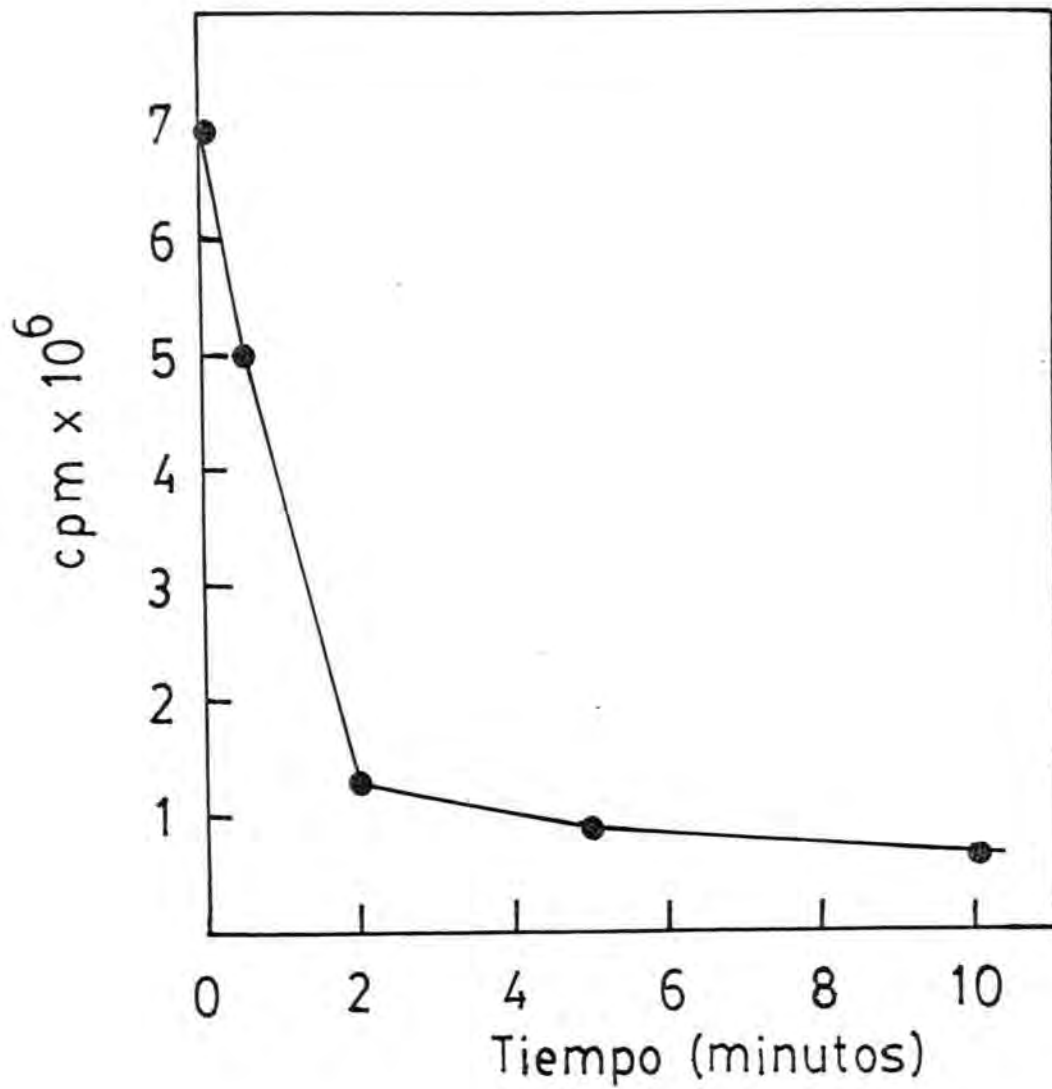


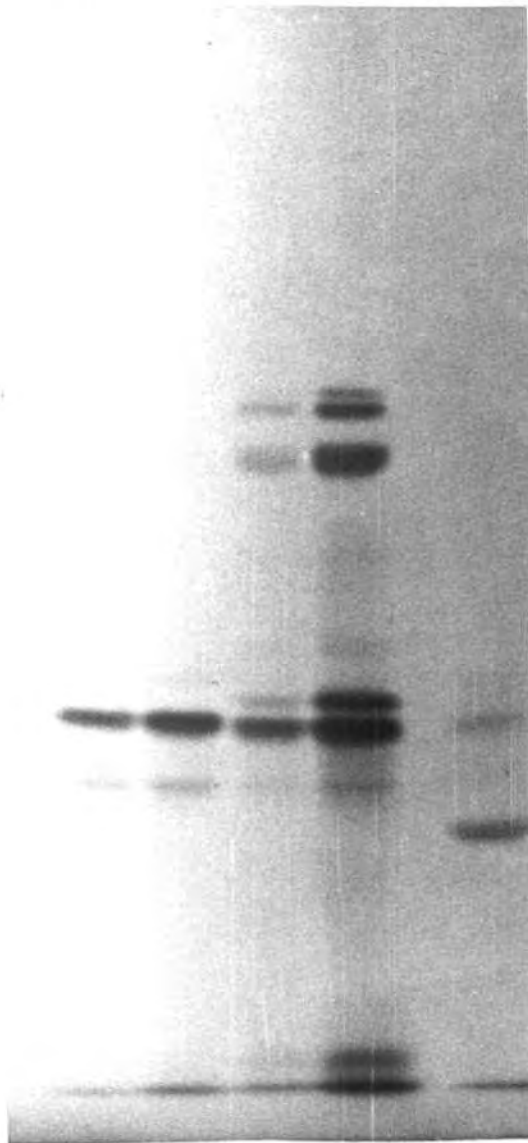
FIGURA 28. AUTORRADIOGRAFIA DE LA SEPARACION ELECTROFORETICA DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESION DE LOS PLASMIDOS pJB2, pJB3.1 y pUC18.

El tamaño de los productos de expresión se determinaron por comparación con marcadores de peso molecular. En los diferentes carriles, se muestran los resultados obtenidos expresando los distintos plásmidos en las condiciones que se indican:

- 1) Productos de expresión del plásmido pUC18 en caseína; 2) Productos de expresión del plásmido pUC18 en hidrolizado de caseína + 10 mM ramnosa; 3) Productos de expresión del plásmido pJB3.1 en caseína; 4) Productos de expresión del plásmido pJB3.1 en caseína + 10 mM ramnosa 5) Productos de expresión del plásmido pJB3.2 en caseína 6) Productos de expresión del plásmido pJB2 en caseína + 10 mM ramnosa.

Como marcadores de peso molecular se utilizó: Miosina (205.000) -galactosidasa (116.000) , fosforilasa b (97.400) Albumina bovina (66.000) Albúmina de huevo (45.000) y anhidrasa carbónica (29.000) expresado en kilodaltons.

1 2 3 4 5 6



116
97,4

66

45

29

FIGURA 29. AUTORRADIOGRAFIA DE LA SEPARACION ELECTROFORETICA DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESION DE LOS PLASMIDOS pJB3.1 Y pJB4.2.

El tamaño de los productos de expresión se determinaron por comparación con los marcadores de peso molecular detallados en la figura 28. En los diferentes carriles se muestran los resultados obtenidos expresando los distintos plásmidos en las condiciones que se indican:

- 1) Productos de expresión del plasmido pJB4.2 en hidrolizado de caseína.
- 2) Productos de expresión del plásmido pJB4.2 en hidrolizado de caseína + 10 mM ramnosa.
- 3) Productos de expresión del plasmido pJB3.1 en hidrolizado de caseína + 10 mM ramnosa.

1 2 3 4

116
97,4

66

45

29

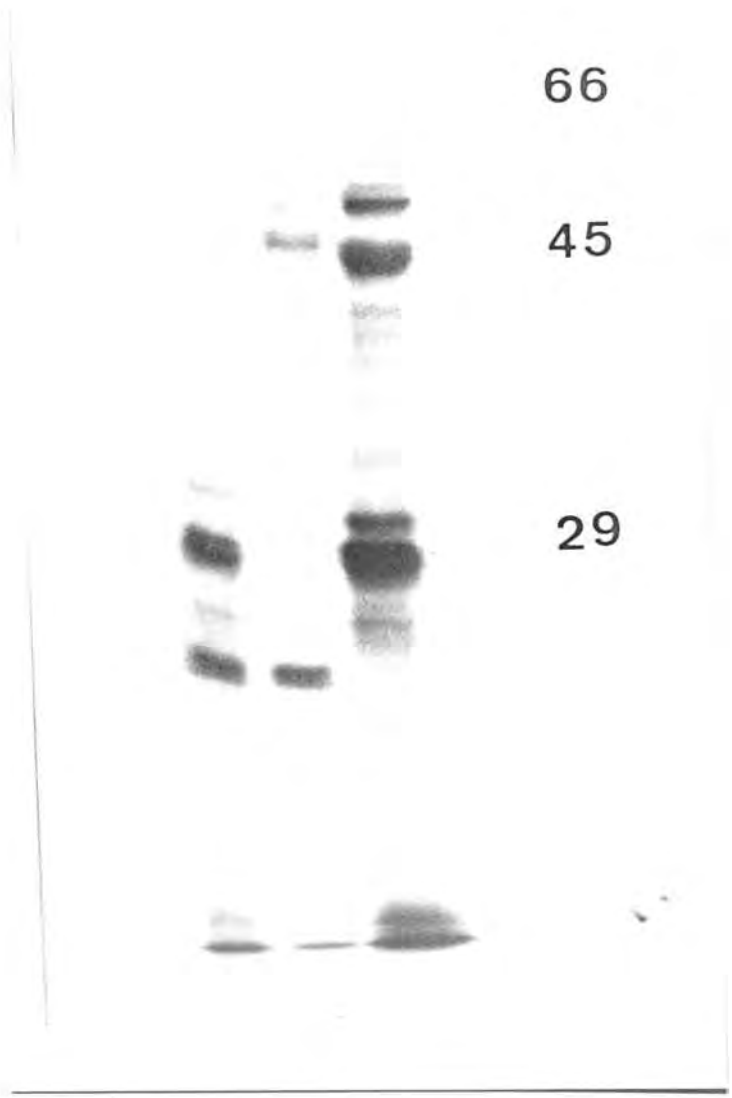


TABLA 7

PESO MOLECULAR DE LOS POLIPEPTIDOS OBTENIDOS POR EXPRESION DE PLASMIDOS.

| Plásmido | Peso molecular (daltons) | |
|----------|--------------------------|----------------|
| | Medio no inductor | Medio inductor |
| pUC18 | 27.000 | 27.000 |
| | 29.000 | 29.000 |
| | 34.000 | 34.000 |
| PJB2.1 | 24.000 | 24.000 |
| | 29.000 | |
| PJB3.1 | 27.000 | 27.000 |
| | 29.000 | 29.000 |
| | 33.000 | 33.000 |
| | 53.000 | 53.000 |
| | 61.000 | 61.000 |
| | 62.000 | 62.000 |
| PJB4.2 | 24.000 | 24.000 |
| | 29.000 | 53.000 |
| | 34.000 | |

3.11. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD L-RAMNOSA ISOMERASA EN MUTANTES Rha⁻ TRANSFORMADOS CON DIVERSOS PLASMIDOS.

Puesto que no se disponia de una cepa de E.coli Rha⁻ cuya mutación pudiese ser asignada a los genes rhaA o rhaC y ante la imposibilidad de determinar fenotípicamente sobre cual de estos dos genes tenía la mutación la cepa Frag1 se creyó conveniente abordar el estudio de la actividad de la enzima L-ramnosa isomerasa en extractos celulares obtenidos de mutantes puntuales Rha⁻ (cepas Frag1, AT753, RhaD62) previamente transformadas con plásmidos recombinantes que contenían parte del locus rha y que se detallan en la tabla .

La actividad de este enzima se determinó por cuantificación de la ramnulosa formada por acción de dicho enzima sobre la ramnosa, mediante el método colorimétrico descrito por Dishe y Borenfreud (9). Este método se basa en la reactividad que presentan las metil pentosas (como la ramnosa) en presencia de cisteina, ácido sulfúrico y carbazol que conduce a la formación de un compuesto coloreado que presenta un máximo de absorción a 560 nm.

En la tabla 8 se detallan las actividades específicas de los transformantes analizados, especificando en cada caso la cepa utilizada y el plásmido con el que ha sido transformado.

Los resultados obtenidos demuestran que todos los mutantes Rha⁻ analizados , transformados con el plásmido pJB3.1 presentan niveles de actividad L-ramnosa isomerasa del orden de 5-10 veces superior a la determinada en cepa 1 , por crecimiento en presencia y ausencia de ramnosa. Las cepas Frag1, AT753 transformadas con el plásmido pJB2.1 y la cepa RaD62 transformada con los plásmidos pJB3.2 y pJB3.2.2 presentan niveles de actividad próximos a cepa 1 cuando su crecimiento se ha realizado en presencia de ramnosa y carecen de ella cuando han crecido en ausencia de

TABLA 8
 ACTIVIDAD L-RANNOZA ISOMERASA EN MUTANTES Rha⁻ PREVIAMENTE TRANSFORMADOS CON DIVERSOS
 PLASMIDOS RECOMBINANTES.

| Cepa trans- formada. | Plasmido utilizado. | L-Rannosa isomerasa A) | |
|-------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| | | CAA + Rha | CAA |
| Cepa 1 | | 4,1 | 0,5 |
| Frag 1 | pJB2.1 | 3,2 | 0,03 |
| Frag 1 | pJB3.1 | 45,3 | 38,8 |
| Frag 1 | pJB4 | 11,3 | 0,02 |
| Frag 1 | pJB3.2 | 0,01 | 0,02 |
| Frag 1 | pJB3.2.2 | 0,03 | 0,02 |
| Frag 1 | pUC18 | 0,02 | 0,02 |
| AT753 | pJB2.1 | 2,10 | 0,17 |
| AT753 | pJB3.1 | 22,20 | 20,10 |
| AT753 | pJB4 | 10,04 | 0,20 |
| AT753 | pJB3.2 | 0,20 | 0,18 |
| AT753 | pJB3.2.2 | 0,19 | 0,18 |
| AT753 | pUC18 | 0,20 | 0,19 |
| RhaD62 | pJB2.1 | 0,60 | 0,20 |
| RhaD62 | pJB3.1 | 22,40 | 18,24 |

(continuación tabla 8)

| | | | |
|--------|----------|------|------|
| RhaD62 | pJB3.2 | 4,50 | 0,40 |
| RhaD62 | pJB3.2.2 | 3,10 | 0,38 |
| RhaD62 | pJB4.2 | 0,41 | 0,25 |
| RhaD62 | pUC18 | 0,38 | 0,32 |

A) Determinada según se detalla en el apartado 2.4.2.1 y expresada en micromoles de ramulosa formada en 10 minutos y por milígramo de proteína.

ramnosa. Los mutantes Rha⁻ analizados, transformados con el plásmido pJB4 presentan niveles de actividad dos veces superior a cepa 1, por crecimiento en presencia de ramnosa y carecen de la misma cuando el crecimiento se ha realizado en ausencia de ramnosa. En todos los demás transformantes analizados no se observaron diferencias significativas, siendo en todos los casos prácticamente cero a excepción de los transformantes obtenidos a partir de la cepa RaD62 que presentan la misma actividad que la cepa progenitora.

3.12 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD L-RAMNOSA PERMEASA EN MUTANTES rha^- TRANSFORMADOS CON DIFERENTES PLASMIDOS.

La actividad L-ramnosa permeasa se determinó en mutantes puntuales rha^- previamente caracterizados como $rhaC^-$, $rhaB^-$ o $rhaD^-$ y que habían sido transformados con diversos plásmidos recombinantes que contenían parte del locus rha .

Así mismo, se procedió al estudio de dicha actividad en la cepa DF903, que posee una delección que va desde $pfkA$ a rha , previamente transformada con los plásmidos pJB2.1, pJB3 y pJB4.

La actividad se determinó según el protocolo descrito en el apartado 2.4.2.2, utilizando ramnosa marcada radioactivamente con ^{14}C . Se utilizó una concentración de ramnosa 0,2 μ moles/ml y una radioactividad específica de 0,8 μ Ci/ μ mol. La actividad se expresa en nanomoles de ramnosa incorporada por minuto y por miligramo de proteína. Para ello se supuso que 10^9 células corresponden a una proteína de 220 μ g. Esta relación se estableció gracias a estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio con la cepa de E.coli (cepa 1), en el que se correlacionó el número de células con la concentración de proteínas en μ g (125).

En la tabla se detallan las actividades L-ramnosa permeasa determinadas en células previamente inducidas por la presencia en el medio de cultivo de 10 mM ramnosa. Cuando las mismas cepas crecieron en medio mínimo que contenía hidrolizado de caseína al 0,5%, no se observó actividad L-ramnosa permeasa en ninguna de ellas, por lo que no se detallan en la tabla.9

Se detecta de este modo, la entrada de ramnosa en aquellos mutantes rha^- que han sido transformados con plásmidos recombinantes que contenían el gen capaz de complementar la mutación propia de cada cepa rha^- estudiada.

Por otra parte, cabe destacar una mayor actividad L-ramnosa permeasa cuando la cepa RaD62 es transformada con

TABLA 9

ACTIVIDAD L-RAMNOSA PERMEASA EN MUTANTES Rha⁻ TRANSFORMADOS CON DIVERSOS PLASMIDOS

| Cepa transformada | Plásmido utilizado | Actividad enzimática A) |
|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Frag 1 | pJB2.1 | 7 |
| Frag 1 | pJB3.1 | 0,1 |
| Frag 1 | pJB3 | 0,15 |
| AT753 | pJB2.1 | 8 |
| AT753 | pJB3.1 | 0,2 |
| AT753 | pJB3 | 0,13 |
| RaD62 | pJB2.1 | 5 |
| RaD62 | pJB3.1 | 8 |
| RaD62 | pJB3 | 10 |
| RaD62 | pUC18 | 5,2 |
| DF903 | pJB2.1 | 0 |
| DF903 | pJB3.1 | 0 |
| DF903 | pJB3 | 0 |
| Cepa 1 | ---- | 8 |

A) Actividad L-ramnosa permeasa determinada en células inducidas por ramnosa y expresada en nanomoles de ramnosa incorporada por minuto y por miligramo de proteína.

el plásmido pJB3 que cuando es transformada con el plásmido pJB3.1, no detectandose por otra parte, actividad permeasa en ningún transformante de la cepa DF903 estudiado.

4. DISCUSSION.

4.1 PREPARACION DE UNA SONDA GENOMICA PARA EL CLONAJE Y ESTUDIO DEL OPERON rha

Uno de los aspectos basicos para la clonación del operón de la ramnosa ha sido el poder disponer de un fragmento de DNA de E.coli perteneciente al locus rha que ha sido utilizado como sonda para el analisis de distintas genotecas, obtenidas tras digestión del DNA de E.coli (cepa 1) con los enzimas de restricción adecuados y utilizando como vector de clonación el bacteriofago λ L47.1.

Para la obtención de dicha sonda genómica se utilizó la cepa ET1248, que se caracteriza por poseer insertado en el locus rha el fago lambda cI857 b515 b519 xisam Sam7. Este profago que puede ser facilmente inducido por un incremento de temperatura de 32 a 42 °C, ha sido ampliamente utilizado en el estudio genético de varios operones.

En nuestro caso y en un primer intento para detectar aquellos fagos inducidos que habían incorporado DNA del genoma de E.coli, se utilizó la selección fundamentada en el genotipo Pel⁻, que se basa en la diferente eficiencia de plaqueo del bacteriofago lambda en función del tamaño de su genoma.(106,107)

Así es conocido que el fago lambda cI857 b515 b519 xisam Sam7 que acum. la multiples delecciones que disminuyen su genoma a un tamaño de 44 Kb, muestra una eficiencia de plaqueo extraordinariamente baja cuando se utilizan cepas de E.coli adecuadas. Un aumento en el tamaño del genoma de dicho fago como consecuencia de una escisión aberrante del mismo, implica un incremento paralelo en la eficiencia de plaqueo, de tal forma que los fagos recombinantes podrían ser detectados fácilmente. Sin embargo, y utilizando la cepa JM2222, que se caracteriza por poseer el genotipo Pel⁻ necesario en la selección de fagos recombinantes en función de su tamaño, no fuimos capaces de detectar ningún fago recombinante tras la inducción del profago en la cepa ET1248 (apartado 3.12)

Alternativamente se procedió a la selección de los fagos recombinantes por su fenotipo Spi⁻ basado en la capacidad de infección de cepas lisogénicas para el bacteriófago P2, en este caso, se aislaron diversos fagos que al ser analizados se observó que habían perdido los genes red y gam situados entre el locus att y el gen cI a la vez que habían incorporado DNA del genoma de E.coli.

Dos de estos fagos (λ prha1 y λ prha2) que han sido caracterizados con detalle en el presente trabajo, habían incorporado fragmentos genómicos de por lo menos 6,8 y 7,6 Kb presentando un genoma de 46,8 y 48 Kb respectivamente (apartado 2.13).

El hecho de que la selección mediante el fenotipo Pel⁻ no diera resultados positivos, puede atribuirse tanto al hecho de que el tamaño del genoma de los fagos recombinantes sí bien mayor que el del fago lambda cI857 b515 b519 xis am Sam7 no fuera lo suficientemente grande, o bien a que las placas de lisis de los fagos recombinantes sobre la cepa JM2222 fueran de tamaño muy pequeño y pasaran desapercibidas (107). Tras el análisis detallado de los fagos lambda prha1 y lambda prha2, se constató que contenían fragmentos de DNA genómicos de E.coli adyacentes al punto de inserción del bacteriófago lambda cI857 b515 b519 xis am Sam7 en el genoma de E.coli. Sin embargo las evidencias de que los fragmentos clonados correspondían al locus rha, se apoyaban únicamente en los datos genéticos que argumentaban la inserción de dicho fago en algún lugar del operón rha (116). Con el objetivo de confirmar que los fragmentos genómicos clonados contenían secuencias pertenecientes al locus rha, se procedió a análisis genómicos de distintos mutantes de inserción del transposón Tn5 seleccionados por su fenotipo Rha⁻. Dichos resultados demostraron claramente que la mayor parte de las inserciones podían ser detectadas utilizando el fragmento BglI de 2,2 Kb (apartado 3.3.2). Ello confirmaba por una parte, que el DNA clonado contenía secuencias pertenecientes al locus rha y por otra parte, que la sonda BglI de 2,2 Kb podía ser utilizada en los aná-

lisis de las genotecas de E.coli para el aislamiento de clones conteniendo la totalidad del operón rha. Además, el análisis genómico de la cepa DF903 que posee una delección rha-pfkA con la sonda BglI anteriormente mencionada, mostró una ausencia total de señales de hibridación, evidenciando de nuevo que el fragmento BglI de 2,2 Kb pertenecía al locus rha.

Cabe mencionar que dos de las inserciones de Tn5, no han sido localizadas con certeza ya que los datos obtenidos de los análisis genéticos permiten una doble interpretación, una de ellas implicaría la inserción dentro del fragmento BamHI de 6,6 Kb del transposón Tn5. Otra posibilidad es que la inserción estuviera situada fuera del mismo y en una posición no determinada, ya que el análisis genómico de estos mutantes permitió detectar un fragmento homólogo a la sonda de idéntico tamaño que el fragmento BamHI de 6,6 Kb.

4.2 CONSTRUCCION DE GENOTECAS DE E.COLI Y AISLAMIENTO DE CLONES CORRESPONDIENTES AL OPERON rha

Todas las genotecas obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo, han sido construidas utilizando el bacteriofago lambda L47.1 (102). Este fago presenta las ventajas de poder ser utilizado con los enzimas de restricción BamHI, EcoRI y HindIII, presentando en todos los casos una capacidad de clonaje entre 4 y 20 Kb. Además en el caso de clonaje utilizando el enzima BamHI los fagos recombinantes pueden ser seleccionados mediante el fenotipo Spi⁻ ya que la sustitución del fragmento central por DNA genómico da lugar a la pérdida de los genes red y gam (apartado 3.1.2.).

De los datos obtenidos a partir de los análisis mediante blots genómicos del DNA de E.coli con distintos enzimas de restricción se seleccionó el enzima BamHI para la construcción de la primera genoteca.

Este enzima generaba un fragmento de restricción de 6,6 Kb que potencialmente podía contener la totalidad del operón rha y cuyo tamaño permitía su clonación en el bacteriofago lambda L47.1.

Una vez clonado y caracterizado el fragmento genómico BamHI de 6,6 Kb (apartado 3.3.1) se comprobó que este clon complementaba fenotípicamente la totalidad de mutantes puntuales Rha⁻ de que disponíamos, a excepción de los mutantes en el gen rhaD que codifica para la ramnulosa-1-fosfato aldolasa. Estos datos sugerían claramente que no se había clonado la totalidad del locus rha, lo cual planteaba la necesidad de aislar nuevos clones que se extendieran más allá de las secuencias clonadas previamente.

Antes de proceder a este nuevo propósito, fué de gran utilidad el contrastar nuestros datos con los obtenidos por otros autores que habían clonado con anterioridad secuencias correspondientes a genes situados próximos al operón rha. Así Albin y Silverman (3,4) y Touati (154) habían clonado y caracterizado los genes cpxA y sodA respectivamente, localizados en el cromosoma de E.coli próximos al operón

rha (12).

Fué interesante constatar que el mapa de restricción de la región clonada por Albin y Silverman que contenía los genes glpK y cpxA, solapaba parcialmente la región clonada por nosotros. Dichos autores localizaron el gen cpxA en un fragmento EcoRI-BamHI de 2 Kb que presentaba homología con un fragmento genómico EcoRI de 7 Kb y que con toda probabilidad se corresponde con el fragmento EcoRI de 6,6 Kb identificado por nosotros y que contiene a su vez el fragmento EcoRI-BamHI de 2 Kb. Así mismo, Touati ha localizado el gen sodA que codifica para la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, en un fragmento EcoRI de 7 Kb, describiendo además que dicho fragmento contiene una única diana BamHI que lo divide en dos, con tamaños de 4,85 y 2,15 Kb, estando el gen sotA localizado en el subfragmento de 4,85 Kb.

Estos datos nos permiten suponer que el fragmento EcoRI-BamHI de 2-2,15 Kb identificado por Silverman en 1984 (3,4) y Touati en 1983 (154) se corresponde con un fragmento de unas 2 Kb que contiene el plásmido pJB1 clonado por nosotros.

Además el fragmento de 4,85 Kb identificado por Touati, se correspondería con el subfragmento de 4,7 Kb presente en el plásmido pJB2. Las pequeñas discrepancias en el tamaño de los fragmentos podrían ser atribuidas a diferencias en los métodos analíticos utilizados.

Asumiendo que la región clonada por nosotros solapaba con las previamente clonadas por Albin y Silverman y Touati, parecía evidente que el locus rha debería extenderse más allá del fragmento EcoRI-BamHI de 2 Kb insertado en el plásmido pJB2, en dirección al minuto 87 con respecto al mapa genómico de E.coli (12).

Utilizando el fragmento EcoRI-BamHI de 2 Kb como sonda, para el análisis mediante blots genómicos de DNA de E.coli condistintos enzimas de restricción, se pudo detectar la existencia de dos fragmentos potencialmente útiles para el clonaje del resto del operón rha.

El enzima EcoRI que generaba un fragmento homólogo de 15 Kb y que por tanto podía clonarse en el bacteriófago

lambda L47.1, fué elegido para la construcción de la nueva genoteca. Además este fragmento aportaría el clonaje de 13 Kb adicionales de DNA que con toda seguridad contendría el resto de genes del locus rha ya que este operón está constituido por 5 o 6 genes. Si consideramos que es necesario por término medio 1-1,2 Kb de DNA para codificar una proteína el operón rha se extendería sobre un fragmento de 6-7 Kb.

El enzima HindIII pese a que generaba un fragmento de 21 Kb, no nos pareció apropiado por dos razones: primera y principal era que no existía ninguna diana HindIII en la región previamente clonada, lo cual no nos permitía determinar en absoluto el número de kilobases que podríamos avanzar hacia el minuto 87, y por otra parte el tamaño del fragmento estaba en el límite de poder ser clonado en el fago lambda L47.1.

Ensayos de complementación con la nueva región clonada constataron la posibilidad de complementar la mutación en gen rhaD. Dado que en la actualidad no se han caracterizado mutaciones rhaA, que codifica la L-ramnosa isomerasa, no ha sido posible ensayar la capacidad de nuestros clones para complementar fenotípicamente dichos mutantes. De cualquier modo el hecho de que la región clonada se extendiera sobre 22 Kb de DNA genómico, permitió suponer que se había clonado también dicho gen rhaA, tal y como después se puso de manifiesto.

Como consecuencia del clonaje del operón rha en dos etapas no se disponía de ningún clon que contuviera la totalidad del operón rha. Esto nos llevó a la construcción de un nuevo plásmido recombinante conteniendo la totalidad del operón rha. Este plásmido recombinante denominado pJB4 contiene un fragmento de DNA genómico BamHI-HindIII de 10 Kb que es capaz de complementar todas las mutaciones puntuales en los distintos genes del locus rha. Si bien éste plásmido era capaz de complementar cada una de las mutaciones puntuales caracterizadas como rhaC, rhaB y rhaD, sorprendentemente, no fué capaz de complementar una delección del operón

entero que se extiende desde rha a pfkA, hasta este momento no ha sido posible establecer las causas de esta ausencia de complementación. Cabe pensar sin embargo que puedan existir secuencias adicionales a los propios genes estructurales o a los elementos de control primarios que estén involucrados en la expresión de dicho operón y que no esten clonados en este plásmido. En este sentido, cabe destacar el hecho de que este plásmido pJB3 complementa más eficientemente mutaciones en el gen rhaD que el plásmido pJB3.1, esto apuntaría a que las secuencias adicionales presentes en el plásmido pJB3 podrían favorecer la expresión de ciertos genes estructurales.

A partir de los datos obtenidos en los experimentos de complementación fenotípica ha sido posible establecer la ordenación relativa de los genes rhaC y rhaB con respecto al gen rhaD. Así se ha observado que el plásmido pJB 3.2.2 que contiene un fragmento BamHI-HindIII de 3 Kb únicamente es capaz de complementar mutantes caracterizados como rhaD (ramnulosa-1-fosfato aldolasa. El fragmento clonado en el plásmido pJB3.2.2 está localizado en posición más próxima al minuto 87 que los fragmentos insertados en los demás plásmidos utilizados en los experimentos de complementación.

4.3 ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE MUTANTES Rha⁻ TRANSFORMADOS CON DIVERSOS PLASMIDOS CONTENIENDO SECUENCIAS DEL LOCUS Rha⁻

Como ya se ha mencionado anteriormente no se ha dispuesto de ningún mutante en el gen rhaA que codifica para la L-ramnosa isomerasa. Si bien la mayoría de actividades enzimáticas codificadas por el operón rha son de difícil determinación, debido principalmente a la no disponibilidad de sustratos comerciales. La L-ramnosa isomerasa constituye una excepción ya que utiliza L-ramnosa como sustrato, siendo además su ensayo de fácil determinación.

Ello nos llevó a tratar de identificar y localizar el gen rhaA dentro de la región clonada mediante ensayos de actividad L-ramnosa isomerasa en extractos celulares en mutantes de E.coli Rha⁻ transformados, con diversos plásmidos recombinantes, conteniendo distintas secuencias del operón rha.

Así se ha podido determinar que el gen rhaA estaría localizado en el fragmento EcoRI-HindIII de 5,3 Kb y se extendería sobre las dianas BamHI y SalI presentes en este fragmento.

Es interesante destacar el hecho de que los plásmidos que contienen el fragmento EcoRI-HindIII de 5,3 Kb parecen expresar, constitutivamente, el gen de la L-ramnosa isomerasa, lo cual dificulta la comprensión de como el mecanismo de control positivo descrito para el operón de la ramnosa, afectaría la expresión de dicho gen.

La medida de los niveles de la actividad isomerasa ha permitido también, ratificar la localización de los elementos de control y del gen rhaD previamente determinado por experimentos de complementación.

Así mismo, la determinación de la actividad L-ramnosa permeasa en mutantes Rha⁻ transformados con diversos plásmidos recombinantes indicaría que el gen de la L-ramnosa permeasa no estaría presente en el fragmento de 22 Kb clonado. Sin embargo esta interpretación podría no ser correcta ya que por una parte Lin y col (E.C.C.Lin, comunicación

personal) han encontrado niveles de actividad L-ramnosa permeasa muy bajos, comparados con los que se detectan en el sistema de la fucosa y por otra parte por la dificultad en distinguir, con el tipo de ensayo utilizado, transporte a través de membrana y metabolización celular de la ramnosa. Cabe destacar, que en todos los casos cuando se transformaba con los plásmidos capaces de complementar fenotípicamente la mutación, se obtenían niveles de incorporación de ramnosa similares a los detectados en la cepa tipo salvaje (cepa 1), no observándose el transporte incrementado que sería de esperar por efecto del incremento de la dosis de los genes expresables, causada por las múltiples copias del plásmido tras la transformación.

4.4 CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DE EXPRESION DE LOS GENES CLONADOS.

Otro de los aspectos ha sido el de identificar los productos de expresión, codificados por la región clonada. Estos estudios se han centrado sobre el fragmento BamHI-HindIII de 10 Kb que conocíamos que era capaz de complementar las mutaciones puntuales en los genes rha, rhaB y rhaD y que mediante otras evidencias, habíamos determinado que contenía el gen rhaA (apartado 3.11).

Como método de expresión, se utilizó el sistema de maxicélulas por su simplicidad y reproducibilidad. Intentos de expresar dichos plásmidos en sistemas de minicélulas (47) fueron descartados ya en sus fases iniciales por la laboriosidad de las mismas y por el elevado fondo de expresión que se obtenía, lo cual dificultaba enormemente la detección de las proteínas codificadas por los plásmidos.

La región BamHI-HindIII de 10 Kb expreso de forma clara un conjunto de 5 a 6 polipéptidos, si bien, la asignación de cada uno de estos productos de expresión a un gen en concreto no se ha podido establecer con certeza.

La banda correspondiente a 24.000-25.000 kilodaltons parece contener dos polipéptidos de tamaño muy similar y probablemente corresponden a las proteínas de control. Las evidencias en este sentido son dos, por una parte de que su expresión es constitutiva y por otra que son selectivamente expresados por un plásmido que contiene un fragmento BamHI-EcoRI de 4,6 Kb, caracterizado por complementar mutaciones en el gen rhaC. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Lin y col. (comunicación personal) según los cuales la región de control estaría compuesta por dos genes de tamaño similar, denominados rhaR y rhaS situados en posición contigua.

Un hecho curioso asociado con la expresión de las probables proteínas de control del operón rha, es que si bien no requieren de la presencia de ramnosa para su síntesis, cuando la cepa transformada con el plásmido que contiene dicha

zona se hace crecer en presencia de dicho azúcar se produce una intensa represión del gen de la β -lactamasa. En estos momentos no conocemos si esta represión es específica de la β -lactamasa o se puede extender también a la represión de otros genes, pudiendo ser éste un mecanismo mediante el cual en presencia del inductor (ramnosa) se produciría una inducción de la expresión de los genes del sistema de la ramnosa a la vez que una concomitante represión de otros sistemas genéticos.

Referente a los productos de expresión corresponden probablemente a los productos de los genes estructurales, sin embargo es difícil asignar cada uno de ellos al producto de un gen específico. No obstante y de forma tentativa, estos polipeptidos pueden atribuirse a proteínas específicas, así el polipeptido de 33.000 Kd podría corresponder a la ramnulosa-1-fosfato aldolasa ya que por una parte se conoce que la proteína nativa tiene un peso molecular de 130.000-135.000 Kd (42), lo cual concordaría con un tetramero de dicho polipeptido. Además, este polipeptido no se sintetiza cuando se expresan plásmidos que carecen del fragmento SalI-HindIII de 2,3 Kb en el cual hemos localizado el gen rhaD.

Por otra parte, el polipeptido de 53.000 Kd podría corresponder a la ramnulosa quinasa ya que su síntesis parece no alterarse cuando se elimina el fragmento SalI-HindIII que abarca el gen de la aldolasa y parte de la isomerasa. Estos resultados estarían en contradicción con los experimentos de complementación de la cepa AT753 caracterizada como rhaB. Sin embargo, estudios realizados con esta cepa, evidenciaron la no excreción de ramnulosa al medio de cultivo cuando crecía en presencia de ramnosa, de forma contraria a lo que ocurriría en mutantes rhaB (117). Este resultado, justificado en un principio como una mutación polar del tipo descrito por Power (117), nos llevó a pensar que este mutante descrito inicialmente como rhaB, era realmente un mutante en la región de control. En este sentido, cuando se utilizaba el plásmido pJB2 para complementar el mutante AT753 se observaba un menor crecimiento en medios con ramnosa que cuando se utilizaba el

plásmido pJB2.1, a pesar de que los dos plásmidos contienen el fragmento BamHI-EcoRI de 4,6 Kb en común. Estos resultados pueden explicarse asumiendo que el gen de la quinasa estaría situado en el fragmento EcoRI-BamHI de 2 Kb y que la menor capacidad de crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pJB2 sería atribuido a una acumulación de ramnulosa-1-fosfato como consecuencia de una alta producción de ramnulosa quinasa, la cual está descrito que resulta tóxico para E.coli ().

Por exclusión el polipeptido de 61.000 Kd debería corresponderse a la ramnosa isomerasa. Cabe señalar también la existencia de una banda débil de 62.000 Kd que no ha sido atribuida a un gen determinado del sistema de la ramnosa.

La expresión de los polipeptidos de 33.000, 53.000 y 61.000 se ve incrementada por la presencia de ramnosa en el medio de cultivo, si bien en condiciones de no inducción se detecta un nivel basal de expresión bastante elevada, lo que indicaría una expresión semiconstitutiva en ausencia de las proteínas de control.

El papel de las proteínas reguladoras en la expresión de los genes estructurales del operón de la ramnosa no ha sido aún evaluado.

4.5 INTEGRACION DE LAS INFORMACIONES OBTENIDAS EN UN MODELO ACTUALIZADO DEL OPERON DE LA RAMNOSA.

Del conjunto de resultados obtenidos, ha sido posible concluir la posición relativa de los distintos genes que constituyen el operón de la ramnosa y que sería el siguiente:

MIN 88

87

 GEN rhaC rhaB rhaA rhaD
 rhaR rhaS

El orden de estos genes esta de acuerdo con el establecido mediante análisis genéticos por Power (117) en E.coli. El único aspecto a tener en cuenta sería el describir dos genes reguladores (rhaR y rhaS) en lugar de un unico gen rhaC si bien dicho autor ya apuntaba hacia esta posibilidad (apartado 1.4).

Estudios genéticos recientes realizados en Salmonella typhimurium por Al-zarban y col. han establecido la organización genética del operón rha en dicho organismo (figura4). Estos autores han situado el gen de la ramnosa permeasa separado de los genes estructurales rhaB, rhaA y rhaD por el gen rhaC. Sin embargo no se ha podido identificar y localizar dicho gen dentro de la zona clonada, tal como se ha indicado anteriormente. El hecho de que este gen se encuentre situado en el fragmento BamHI-EcoRI de 4,6 Kb no parece probable, puesto que el plásmido pJB2.1 que contiene dicho fragmento solo expresa los polipeptidos asignados a los genes de control. Sin embargo, la organización genética del operón de la ramnosa en E.coli presenta notables similitudes con el operón de la ramnosa de Salmonella typhimurium.

Existen diversas evidencias que apuntan hacia el hecho de que los operones de la fucosa y la ramnosa han evolucionado a partir de un ancestro común por duplicación y poste-

rior diferenciación. Sin embargo, los estudios genéticos realizados hasta la actualidad del operón de la fucosa ponen de manifiesto grandes diferencias de organización entre dicho operón y el de la ramnosa.

Así, mientras el operón de la ramnosa tiene una estructura relativamente simple en el que los genes estructurales están regulados por un único sistema de control, el operón de la fucosa, tendría una estructura mucho más compleja en la que un gen regulador coordinaría la expresión de los distintos genes estructurales organizados en cinco operones distintos entre los que se incluiría el gen propanodiol oxidoreductasa, que parece ser un gen repartido entre ambos operones (37).

Existen evidencias adicionales que indican un cierto grado de interacción entre la expresión de los sistemas fuc y rha (98). La caracterización de ambos sistemas constituye un excelente modelo para el estudio tanto de la regulación de la expresión génica en procariotas como de los mecanismos implicados en su evolución. Ya se ha apuntado que la evolución común de los dos sistemas pasaría por una duplicación génica tal y como se explica en el apartado 1.7 y posterior diferenciación de los sistemas génicos correspondientes a causas de presiones selectivas diferentes. En este sentido cabe resaltar que en enterobacterias el operón fuc, probablemente, ha sido fisiológicamente más requerido que el operón rha ya que la fucosa constituye un azúcar integrante de buena parte de las glicoproteínas en animales. Consecuentemente la degradación de determinados sistemas celulares tales como los eritrocitos, pueden vertir cantidades apreciables de este azúcar al sistema digestivo, donde se hallan las enterobacterias. No parece por otra parte que la presencia de ramnosa en los sistemas digestivos de animales, esencialmente en herbívoros, pueda tener el mismo peso específico.

Todo ello llevaría a una presión selectiva sobre el sistema metabólico de la fucosa que habría promovido la evolución hacia un sistema más perfeccionado y más regulado que

el sistema metabólico de la ramnosa. Esta idea sería evidentemente concomitante con la pérdida de determinados sistemas de control o incluso de un gen estructural como la propanodiol oxido-reductasa en el operón rha (37).

En los últimos años se ha descrito, también, una diferencia fundamental entre ambos sistemas metabólicos que hace referencia al control de los mismos en presencia y ausencia de oxígeno. De nuevo el sistema de la fucosa parece mantener una regulación aeróbica - anaeróbica más sofisticada que el sistema de la ramnosa, con un control no solo a nivel transcripcional, sino también a nivel post transcripcional (26). Este constituye un punto importante en la fisiología de las células utilizando este tipo de metilpentosas, mas aún, cuando las regulaciones por presencia o ausencia de oxígeno son fundamentales en los procesos fermentativos que tienen lugar en el sistema digestivo de los animales.

Conclusiones de tipo evolutivo mas definitivo pueden obtenerse por la comparación de los sistemas fuc y rha en bacterias del mismo grupo, cuyos habitats no sean exclusivamente el sistema digestivo de los animales. Así, sería de interés analizar y comparar la genética de estos sistemas en especies de Klebsiella que es bien conocido que se encuentran en las superficies vegetales. Así mismo, sería especialmente relevante comparar estos sistemas con los de otras especies bacterianas no incluidas en el grupo de las enterobacterias.

Quisieramos resaltar aqui, el interés que por todo lo anteriormente dicho, tiene el análisis de estos sistemas genéticos responsables del metabolismo de estos dos azúcares, ciertamente no mayoritarios en la naturaleza pero de unas funciones bien relevantes.

Las posibles diferencias en la conservación de los distintos grupos de genes y de sus elementos reguladores probablemente permitirían establecer conclusiones definitivas sobre los mecanismos de evolución implicados.

5. CONCLUSIONES.

- Se han aislado fagos de transducción especializada, que fueron utilizados para preparar una sonda génica usada en el aislamiento de clones, conteniendo la totalidad del operón rha.
- Se han aislado clones conteniendo fragmentos del operón rha, a partir de genotecas de E.coli preparadas usando como vector el lago lambda L47.1.
- La identificación de genes pertenecientes al operón rha, en la zona clonada, se ha llevado a cabo mediante análisis genómicos de mutantes Rha^- por inserción de Tn5 y de un mutante deleciónado en el operón rha.
- La región clonada se extiende sobre 22 Kb de DNA genómico de las cuales un fragmento BamHI-HindIII de 10 Kb parece contener la totalidad de genes del operón rha.
- Se ha construido una colección de plásmidos conteniendo secuencias que se solapan y se extienden sobre la totalidad de la zona clonada.
- Experimentos de complementación de mutantes Rha^- en los distintos genes del operón rha, han permitido establecer el orden relativo de los genes rhaC y rhaB con respecto al gen rhaD.
- Ensayos de actividad L-ramnosa isomerasa, en extractos celulares de mutantes Rha^- transformados con diversos plásmidos recombinantes conteniendo secuencias del locus rha, han permitido determinar la localización del gen rhaA con respecto a los genes rhaC, rhaB y rhaD.
- La expresión en un sistema de maxicélulas de los plásmidos recombinantes pJB2.1, pJB3.1 y pJB4.2, rinde 5 o 6 polipéptidos de pesos moleculares determinados, asignados de forma tentativa a los productos de los genes rhaA, rhaB

rhaD y a los genes rhaR y rhaS que constituyen los elementos de control.

-La ausencia del gen rhaC en el fragmento insertado en el plásmido pJB3.1 lleva, por mecanismos no bien conocidos, a la expresión semiconstitutiva de los genes estructurales del operón de la ramnosa.

-La incorporación de ^{14}C -ramnosa a células enteras Rha^- transformadas con diversos plásmidos conteniendo fragmentos del operón rha, parece indicar que el gen rhaT que codifica la L-ramnosa permeasa se hallaría fuera de la región clonada.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.-ABOU- SABE, M. (1982). Evolution of the D-ribose operon of Escherichia coli B/r. J.Bacteriol. 150:762-769.
- 2.-ADLER, J., HAZELBANER, G.L., DAHL, M.N. (1983). Chemotaxis toward sugar in Escherichia coli. J.Bacteriol. 115: 824-847.
- 3.-ALVIN, R., SILVERMAN, P.M. (1984). Physical and genetic structure of the glpK- cpxA interval of the Escherichia coli K-12 chromosome. Mol.Gen.Genet. 197:261-271.
- 4.-ALBIN, R., SILVERMAN, P.M. (1984). Identification of the Escherichia coli K-12 cpxA locus as a single gene: Construction and analysis of biologically - active cpxA gene fusions. Mol.Gen.Genet. 197:272-279.
- 5.-AL-ZARBAN, S., L.HEFFERMAN, J.NISHITANI, L.RANSONE, G. WILCOX. (1984). Positive control of the L-rhamnose genetic system in Salmonella typhimurium LT2. J.Bacteriol. 158:603-608.
- 6.-ANDERSON, R.P., J.P.ROTH. (1977). Tandem genetic duplications in phage and bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 31:473-505.
- 7.-ANDREWS, K.S., E.CC.LIN. (1976). Selective advantages of various bacterial carbohydrate transport mechanisms. Fed. Proc. 35:2185-2189.
- 8.-APPLEYARD, R.K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K-12 Genetics. 39:440-445.
- 9.-ASWELL, G. (1957). Colorimetric analysis of sugars. A.Methods y Enzymology, Vol 3, pag 73-105. Academic Press Inc, New York.

- 10.-ANERSWALD,E.A.,G.LUDWIG and H.SCHALLER. (1981). Srtuc-tural analysis of Tn5. Cold Spring Harbor Simposium for Quantitative Biology. Vol XLV:107-113.
- 11.-BACHMANN,B.J. (1972). Pedriguees of some mutants strains of Escherichia coli K-12. Bacteriol Rev.36:525-557.
- 12.-BACHMANN,B.J. (1983). Linkaje map of Escherichia coli K-12. Edition 7. Microbiol Rev. 47:180-230.
- 13.-BADIA,J.,J.ROS y J.AGUILAR. (1985).Fermentation mecha-nisms of fucosa and ramnosa in Salmonella typhimurium and Klebsiella pneumoniae. J.Bacteriol. 161:435-437.
- 14.-BALDOMA,L. (1986). Analisis estructural, funcional y de regulación de la Lactaldehido deshidrogenasa de Escherichia coli.Dpto.de Bioquimica, Fac. Farmacia, Univer.de Barcelona.
- 15.-BARTKUS,J.M.,R.P.MORTLOCK. (1983). Induction of L-fucose isomerase in wild type and D-arabinose utilizing strains of Escherichia coli K-R.Abst.Am. Soc.Microbiol. 216.
- 16.-BENTON,W.D.,R.W.DAVIS. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science. 196:180-186.
- 17.-BERG,D.E. (1977). Insertion and excision of the trans-posable Kannamycin resistance determinant Tn5 in DNA insertions elements, plasmids and episomes.Ed.A.J. BUKHARI. Pag.205. Cold Spring Harbor Laboratory.Cold Spring Harbor. New York.
- 18.-BERG,D.E.,J.DAVIS,B.ALLET and J.D.ROCHOIX (1975). Transposition de R factor genes to bacteriophage λ Proc.Natl.Acad.Sci. 72:3628-3632.

- 19.-BIRNBOIM:H.C.,J.DOLY.(1979).Arapid alkaline extraction procedure for Screening recombinant plasmid DNA Nucleic acids Res.7:1513-1515.
- 20.-BLATTNER,F.R.,B.G.WILLIAMS, A.E.BLECHL,K.DENNISTON-THOMPSON,H.E.FABER,L.A.FURLONG,D.J.GRUNWALD,D.O.KIEFER; D.D.MOORE,E.L.SHELDON and O.SMITHIES (1977).Charon pages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. Science 196:161-166.
- 21.-BOCHNER,B.R., H.C.HUANG,G.L.SCHIEVEN and B.N.AMES (1980) Positive selection for loss of tetracycline resistance. J.Bacteriol. 143: 926-933.
- 22.-BONNER,W.M.,R.A.LASKEY.(1974).A film Detection Method for tritium-Labelled proteins and Nucleic acids in Polyacrilamide gels. Eur.J.Biochem.46:83-84.
- 24.-BORONAT,A.,J.AGUILAR.(1977).Rhannose induce propanediol oxido-reductase in E.coli:purification, properties and comparison with the fucose induced enzyme.J.Bacteriol. 140:320-326.
- 25.-BORONAT,A.,J.AGUILAR.(1981).Experimental evolution of propanediol oxido-reductase in E.coli:comparative analysis of the wild type and mutant enzymes. Biochem.Biophys. Acta.672:98-107.
- 26.-BORONAT,A.,AGUILAR.(1981).Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in E.coli:differences in induction of propanediol oxido-reductase.J.Bacteriol.147:181-185.
- 27.-BRAMMAR,W.S.(1980).Vectors based on bacteriophage lambda genetic engineering vol.2.Principles and Methods. Ed.by Setlow.J.K,Hollaender Plenum Press.53-80.
- 28.-BROMMER,W.M,R.A.Laskey(1979).A film detection Method

- for tritium-Labelled Proteins and Nucleic acids in Polyacrilamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46:83-88.
- 29.-BRUJIN, F. J., J. R. LUPSKI. (1984). The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids. *Gene*. 27:131-149.
- 30.-BUKHARI; A. I., J. A. SHAPIRO, S. ADHYA. (1977) en DNA insertion elements, Plasmids and Episomes. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Labs. New York.
- 31.-BECKER, A., M. GOLD. (1975). Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:581-584.
- 32.-CALVERT, R., W. B. GLATZER. (1978). Proteolytic digestion patterns of spectrin subunits. *FEBS. Lett.* 86:247-250.
- 33.-CAMPBELL, A. (1971). In the bacteriophage lambda Genetic Structure. Ed. A. D. Hershey. pag. 13-44. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor. New York.
- 34.-CAMPBELL, A. (1981). Some General Questions about Movable elements and their implications. Cold Spring Harbor Symposium for Quantitative Biology. Vol. XLV 1-9.
- 35.-CHAKRABARTI, T., Y. M. CHEN, E. C. C. LIN. (1984). Clustering of genes for L-fucose dissimilation by Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 157:984-986.
- 36.-CHAMBERLAIN, J. P. (1979). Fluorographic detection of Radioactivity in Polyacrylamide gel with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Analytical Bioch.* 98:132-135.
- 37.-CHEN, Y. M., E. C. C. LIN. (1984). Dual control of a common L-1,2 propanediol oxidoreductase by L-fucose and L-rannose in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*. 828-832.

- 38.-CHEN,Y.M.,E.C.C.LIN.(1984).Post-transcriptional control of L-1,2-Propanediol oxido-reductasa in the L-fucose pathway of Escherichia coli K-12. J.Bacteriol.157:341-344.
- 39.-CHEN.Y.M.,E.C.C.LIN,J.ROS,J.AGUILAR.(1983).Use of operon fusions to examine the regulation of the L-1,2 propanediol oxido-reductase gene of the fucose system in E.coli K-12. J.Gen.Microbiol.129:3355-3362.
- 40.-CHIU,T.H.,D.S.FERIGOLD.(1964).The purification and properties of L-rhamnulokinase.Biochim. Biophys.Acta. 92:489-497.
- 41.-CHIU,T.H.,D.S.FERIGOLD.(1965).Substrate specificity of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. Biochem.Biophys. Res.Commun.19:511-516.
- 42.-CHIU,T.H.,D.S.FERIGOLD.(1969).L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from E.coli.Crystallization and properties. Biochemistry.8:98-102.
- 43.-CLEVELL,D.B.(1972).Nature of Col E1 plasmid replication in Escherichia coli in the presence of chloranphenicol. J.Bacteriol.110:667-671.
- 44.-COCKS,G.T.,J.AGUILAR,E.C.C.LIN.(1974).Evolution of L-1,2 propanediol catabolism in Escherichia coli by recruitment of enzymes for L-fucose and L-lactate metabolism.J.Bacteriol.118:83-84.
- 45.- COHEN,G.N.,I.SAINT-GIRONS, P.TRUFFA-BACHI.(1977).The evolution of biosyntetic pathaqays.Trends Biochem.Sci. 2:97-99.
- 46.-COZZARELLI,N.R.,J.P.KOCH,S.HAYASHI,E.C.C.LIN.(1965). Growth stasis by accumulated L- -glycerphosfate in Escherichia coli.J.Bacteriol.90:1325-1329.

- 47.-CROOKS, J.M., M.ULLMAN, M.ZOLLER, S.B.LEVY.(1983).Transcription of plasmid DNA in Escherichia coli.Minicells plasmid.10:66-77.
- 48.-CULLUM, J., H.SAEDLER.(1981).DNA rearrangements and evolution.en"Molecular and cellular aspects of microbial evolution".Thirty second Symposium of the Society for General Microbiology.Cambridge Univ.Press.pp 215-228 Cambridge.
- 49.-CURANO, A.V.(1978).Direct demonstration of duplicate tuf genes in enteric bacteria.Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 75:3104-3108.
- 50.-DADAL, F., D.FRAENKEL.(1981).Tn10 insertions in the pfkB Region of Escherichia coli.J.Bacteriology.147:935-943.
- 51.-DAGERT, M., S.D.EHRLICH.(1979).Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli.Cells-Gene.6:23-28.
- 52.-DAVIS, B.D.(1958).On the importance of being ionized. Arch.Biochem.Biophys.87:497-509.
- 53.-DAVIS, R.W., D.BOTSTEIN, J.R.ROTH.(1980).A manual for genetic engineering.Advanced bacterial genetics.Cold Spring Harbor Laboratory.Cold Spring Harbor.New York.
- 54.-DAVIS, L.G., Ph.D.MARK, D.DIBNER, Ph.D.JAMES, F.BATTEY(1986). Basic methods in Molecular Biology.Elsevier Science Publishing Co Inc.New York.
- 55.-DICKERSON, R.E., R.TIMKOVICH, R.J.ALMASSAY.(1976).The cytochrome fold and the evolution of bacterial energy metabolism.J.Mol.Biol.100:473-491.
- 56.-DRETZEN, G., M.BELLARD, P.SASSONE-CORSI, P.CHAMBON.(1981) A reliable Method for the Recovery of DNA fragments from Agarosa and Acrylamide gels.Analytical Biochemis-

try.112:295-298.

- 57.-ENGLESBERG,E.(1957)Physiological basis for rhamnose utilization by a mutant of Pasteurelle pestisII.A single mutational event leading to the production of two enzymes.Arch. Biochem.Biophys.71:179-193.
- 58.-ENGLESBERG,E.,L.S.BARON.(1959).Mutation to L-rhamnose resistance and transduction to L-rhamnose utilization in Salmonella typhosa.J.Bacteriol.78:675-686.
- 59.-EPSTEIN,W.,B.S.KIU.(1971).Potassium transport Loci in Escherichia coli k-12.Journal of Bacteriology.
108:639-644.
- 60.-FAIRBANKS,G.,T.L.STECK,D.F.H.WALLACH.(1971).Electrophoretic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane.Biochemistry.10:2606-2617.
- 61.-FALKOW,S.,H.SCHENEIDER,L.S.BARON,S.B.FORMAL.(1963). Virulence of Escherichia- Shigella genetic hybrids for the guinea pig.J.Bacteriol.86:1251-1258.
- 62.- FRANKLIN,N.(1971).The N operon of lambda:Extent and regulation as observed in fusion to the tryptophan operon of Escherichia coli.En The bacteriophage lambda. Editor A.D.HERSHEY). Pag. 621-638. Cold Spring Harbor Laboratory.Cold Spring Harbor,New York.
- 63.-GHALAMBOR,M.A. y E.C.HEATH.(1962). The metabolism of L-fucose II.The enzymatic cleavage of L-fuculose-1-phosphate. J.Biol.Chem. 237:2427-2433.
- 64.-GOTTESMAN,S.,y J.BECKWITH.(1969). Directed transposition of the arabinose operon: a technique for the isolation of specialized transducing phages for any Escherichia coli gene.J.Mol.Biol. 44:117-127.

- 65.-GREEN,M. y S.S.COHEN.(1956). The enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. J.Biol.Chem. 219:557-568.
- 66.-GUARNEROS,G. y H.ECHOLS.(1970). New mutants of bacteriophage lambda with a specific defect in excision from the host chromosome.J.Molec.Biol. 47:365-374.
- 67.-GUNSALLUS,I.C y D.E.Hand.(1961).The use of bacteria in the chemical determination of total vitamin C. J.Biol Chem. 141:853-858.
- 68.-HACKING,A.J.,J.AGUILAR y E.C.C.LIN.(1978).Evolution of propanediol utilization in E.coli: mutant with improved substrate scavenging power. J.Bacteriol 136:522-530.
- 69.-HACKING,A.J. y E.C.C.LIN.(1976).Disruption of a fucose pathway as a consequence of genetic adaptation to propanediol as a carbon source in E.coli. J.Bacteriol 126:1166-1172.
- 70.-HACKING,A.J. y E.C.C.LIN.(1977).Regulatory changes in the evolution of a catabolic pathway for propanediol in E.coli. J.Bacteriol. 130:832-838.
- 71.-HAMES,B.D.(1981).An introduction to polyacrilamide Gel Electrophoresis. En Gel Electrophoresis of proteins. Editado por B.D.HAMES y D.RICKWOOD. Pag.1-91. Eynsham England.
- 72.-HANABAN,D.(1983).Estudien of transformation of Escherichia coli with plasmids.J.Mol.Biol.166:557-580.
- 73.-HANAHAN,D.(1985).Tecniques for transformation of E.coli. En DNA cloning.Vol.I.Editado por D.M.Glover.I.R.L.Press Oxford.Pag.100-135.
- 74.-HEATH,E.C.,M.A.GHALAMBOR.(1962).The metabolism of L-

- fucose I. The purification and properties of L-fuculose kinasa. *J. Biol. Biochem.* 273:2423-2426.
- 75.-HELLING, R. B., H. M. GOODMAN, H. W. BOYER. (1974). Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* 14:1235-1240.
- 76.-HOHN, B. (1979). In vitro packaging of λ and cosmoid DNA. *Methods enzymol.* 68:299-302.
- 77.-HOHN, B., K. MURRAY. (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles "in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:3259-3264.
- 78.-HOPWOOD, D. A. (1967). Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol. Rev.* 31:373-403.
- 79.-ISBERG, R. R., A. L. LAZAAR, M. SYVANEN. (1982). Regulation of Tn5 by the Right-Repeat Proteins: Control at the level of the transposition Reaction. *Cell.* 30:883-892.
- 80.-ISH-HOROWICZ, D., J. F. BURKE. (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids. Res.* 9:2989-2991.
- 81.-KAN, J. (1983). Cloning with Bacteriophage. In techniques in nucleic acid. Biochemistry. Ed. R. A. Flavell. Vol. B5 pag. 2-61. Cambridge M.A. Elsevier Scientific Publishers. Ireland Ltd.
- 82.-KARN, J., S. BREMMER, L. BARNETT, G. CESARINI. (1980). Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5172-5175.
- 83.-KAYAJANIAN, G. (1968). Studies in the genetics of biotin transducing defective variants of bacteriophage λ . *Virology.* 36:30-41.

- 84.-JEFFCOAT,R.,S.DAGLEY.(1973).Bacterial hydrolases aldolases in evolution.Nature,New Biology.241:186-187.
- 85.-KLINE,E.S.,H.R.MAHLER.(1965).The lactic dehydrogenases de E.coli.Ann.New York.Acad.Sci.119:905-919.
- 86.-KLUYER,A.J.,C.SCHINELLEN.(1937).Uberdie vergarung von rhamnose.Enzymologie.4:7-12.
- 87.-KOSHLAN,D.E,jr.(1976).Role of flexibility in the specificity control and evolution of enzymes.FEBS Lett.
62 Sup.E42-E52.
- 88.-LAEMLI,U.K.(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4.
nature 27:680-685.
- 89.-LANDGRIDGE,J.,P.L.BERGQUIST.(1980).Extraction of Nucleic Acids from Agarose gels.Analytical Biochem.103:264-271.
- 90.-LASKY,L.A.,Z.LEU,J.HXIN,R.J.BRITTEN,E.H.DAVIDSON.(1980). Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNAs.Proc.Natl.Acad. Sci.77:5317-5320.
- 91.-LAWN,R.M.,E.F.FRITCH,R.C.PARKER,G.BLAKE,T.MANIATIS.
(1978).The isolation and characterization of a linked δ and β -globin gene from a cloned library of human DNA.
Cell.15:1157-1161.
- 92.-LEBLANC,D.I,R.P MORTLOCK.(1971).Metabolism of D-arabinose.Origen of a D-ribulokinasa activity in Escherichia coli.J.Bacteriol.106:82-89.
- 93.-LEBLANC,D.J.,R.P.MORTLOCK.(1971).Metabolism of D-arabinose:a new patway in Escherichia coli.J.Bacteriol.
106:90-96.

- 94.-LEDER,P,D.TIEMEIER,L.ENQUIST.(1977).EK2.Derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher roganisms:The λ gt wes system.Science. 196:175-179.
- 95.-LERNER,S.A.T.,T.WU, E.C.C.LIN.(1964).Evolution of catabolic pathway in bacteria.Science.146:1313-1315.
- 96.- LIN,E.C.C.,S.A.LERNER,S.E.Jorgensen.(1962).A method for isolating constitutive mutants for carbohydrate catabolizing enzyme.Biochim.Biophy.Acta.60:422-424.
- 97.-LIN,E.C.C.,A.J.HACKING,J.AGUILAR.(1976).Experimental models of aquisitive evolution.Bio.Science.26:548-555.
- 98.-LIN,E.C.C.,T.T.WU.(1984).Functional divergence of the L-fucose System in mutants of Escherichia coli.Microorganisms as mosel Systems for studying evolution.Ed. Robert Mortlock.Plenum Publishing Corporation.135-164.
- 99.-LINK,C.D.,A.M.REINER.(1982).Inverted repeats surround the ribitol- arabitol genes of E.coli.Nature.298:95-96.
- 100.-LOWRY,O.H.,N.J.ROSEBROUGH,A.L.FARR,R.J.RANDALL.(1951) Protein mesurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem.193:265-275.
- 101.-MANDEL,M.,A.HIGA.(1970).Calcium dependent bacteriophage DNA infection.J.Mol.Biol.53:159-162.
- 102.-MANIATIS,T.,E.F.FRISTSCH,J.SAMBROOK.(1982).Molecular cloning.Cold Spring Harbor Lab.
- 103.-McCARTHY,B.J.,E.T.BOLTON.(1963).An approach to the measinrement of genetic related ness among organisms Proc.Natl.Acad.Sci.50:156-164.

- 104.-MEAGHER,R.B.,L.N.ORNSTON.(1973).Relation ships among enzymes of the β -keto adipate pathway.I:Properties of cis,cis-muconate lactonizing enzyme from Pseudomonas putida .Biochemistry. 12:3523-3530.
- 105.-MEYER,R.,G.BOCH Y J.SHAPIRO.(1979).Transposition of DNA inserted into deletions of the Tn5 kanamycin resistance element. Mol.Gen.Genet. 171:7-12.
- 106.-MURRAY,K.(1977).Applications of bacteriophage lambda in recombinant DNA. Editado por S.WERNER.vol.3. Pagl-133. Academic Press. New York.
- 107.-MURRAY,K.(1983). Phage lambda and molecular cloning.En Lambda II. Editado por R.W.HENDRIX,J.ROBERTS,F.STAHL y R.WEISBERG. Pag. 402-420. Cold Spring Harbor laboratory.
- 108.-MURRAY,N.E y K.MURRAY.(1974).Manipulation of restriction targets in phage lambda to form receptor chromosomes for DNA fragments.Nature. 251:476-478.
- 109.-NEIDHARDT,F.C.,R,WIRTH.,M.W.SMITH y R.V.BOEGELEN.(1980). Selective syntesis of plasmid-codad proteins by Escherichia coli during recovery from chloranfenicol treatment.J.Bacteriol.143:535-539.
- 110.-NOMURA,M.,E.A.MORGAN,S.R.JASCUNAS.(1977).Genetics of bacterial ribosomes.Ann.Rev.Genet.11:297-347.
- 111.-OBRADORS,N.(1987).Utilitzacio anaeróbica de L-1,2-propandiol en enterobacteriaceae.Memoria de Licenciatura.Fac. de Farmacia,Univ. Barcelona.
- 112.-OHNO,S.(1970).Evolution by gene duplication.Springer-Verlag,Heildenberg.

- 113.-OHTA,T.,M.KIMURA.(1971). Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. Nature.233:118-119.
- 114.-OLD,D.C.,P.F.DAVIS,R.M.BARKER.(1980).Transduction of inositol fermenting ability demonstrating phylogenetic relation schips among strains of Salmonella typhimurium Genet.Res.35:215-224.
- 115.-ORSKOV,I.(1974). Genus VI.Klebsiella trevisan 1885. 105 Nom.cons.Opin 13.Jud.Comm.1954 in:Bergey's Manual of determinative bacteriology 8th ed. Ed.R.E.Buchanan and N.E.Gibbons.Williams and Wilkins Baltimore pp.321-325.
- 116.-PAHEL,G.,F.R.BLOOM, B.TYLER.(1979).Delection mapping of the pol A - MetB region of the Escherichia coli chromosome.J.Bacteriol.138:653-656.
- 117.-POWER,J.(1967).The L-rhamnose genetic system in Escherichia coli K-12.Genetics.55:557-568.
- 118.-RAINBAUD,O.,M.SCHWARTZ.(1984).Positive control of transcription initiation in Bacteria.Ann.Rev.Genetics.18:173-206.
- 119.-RICCIARDI,R.P.,J.S.MILLER y B.E.ROBERTS.(1979) Purification and mapping of specific mRNA by hbridization selection and cell free translation. Proc. Acad. Sci. 76: 4927-4932.
- 120.-RAMBACH,A.,P.TIDLAIS.(1974).Bacteriophage lambda having EcoRI endonucleasases sites only on the non essential region of the genome.Proc.Natl.Acad.Sci.71:3927-3930.
- 121.-RIGBY,P.W.J.,M.DIECKMANN,C.RHODES,P.BERG.(1977). Labeling deoxyribonucleic acid to hight specific

- activity in vitro by nick translation with DNA polimerasa I. *J.Mol.Biol.* 113:237-240.
- 122.-RILEY, M. (1984). Arrangement and rearrangement of Bacterial genomes in microorganisms as model Systems for studying evolution. Ed. R. P. MORTLOCK. Plenum Press. New York.
- 123.-RILEY, M., A. ANILIONIS. (1978). Evolution of the bacterial genome. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:519-560.
- 124.-RILEY, M., GLANSDORFFIN. (1983). Cloning the Escherichia coli K-12, argD gene specifying acetylornithine δ -transaminase. *Gene.* 241:335-339.
- 125.-ROS, J. (1984). Metabolisme de fucosa y ramnosa en Escherichia coli: duplicitat genètica, estructural y de regulació per la propanediol oxido-reductasa i comparació amb l'enzim de Salmonella typhimurium i Klebsiella pneumoniae. Dpto. de Bioquímica, Fac. Farmacia, Univ. de Barcelona.
- 126.-ROS, J., J. AGUILAR. (1984). Genetic and estructural evidence for the presence of propanediol oxido-reductase isoenzymes in Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.* 130:687-692.
- 127.-ROS, J., J. AGUILAR. (1985). Propanediol oxido-reductase of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Salmonella typhimurium. Aspects of interspecies estructural and regulatory differentiation. *J. Biochem.* 231:145-149.
- 128.-ROTHSTEIN, S. J., R. A. JORGENSEN, K. POSTLE, W. S. REZNIKOFF. (1980). The inverted repeats of Tn5 are functionally different. *Cell.* 19:795-805.
- 129.-SANCAR, A., A. M. HACK, W. D. RUPP. (1979). Simple method for identification of plasmis - code protein. *J. Bacteriology.* 137:692-693.

- 130.-SANDERSON,K.E.,M.DEMEREC.(1965).The linkage map of Salmonella typhimurium.Genetics.51:897-913.
- 131.-SANDERSON,K.E.,J.R.ROTH.(1983).Linkage map of Salmonella typhimurium.Edition VI.Microbiol Rev.47:410-453.
- 132.-SAWADE,H.,Y.TAKAGI.(1964).The metabolism of L-rhamnose in E.coli.III L-rhamnose phosphate aldolase.Biochim. Biophys.Acta.92:26-32.
- 133.-SCHLEIF,R.F.,P.C.WENSINK.(1982).Practical methods in Molecular Biology.Springer-Verlag.New York.
- 134.-SCHRENK,W.J.,R.A.WEISBERG.(1975).A simple method for making new transducing lines of cliphage lambda.Mol. general Genetic.137:101-107.
- 135.-SCHWARTZ,N.B.,D.S.FERIGOLD.(1972).L-rhamnulose-1-phosphate aldolase from Escherichia coli III.The role of divalent cations in enzyme activity.Bioinorgan.Chem.2:75-86.
- 136.-SHAW,K.J.,C.M.BERG.(1979).Escherichia coli auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. Genetics.92:742-747.
- 137.-SHEPPARD,D.E.,E.ENGLERBERG.(1967).Further evidence for positive control of the L-arabinose System by gene araC.J.Mol.Biol.24:443-454.
- 138.-SHAMANA,D.K.,K.E.SANDERSON.(1979).Uptake and catabolism of D-Xylose in Salmonella typhimurium LT2.J.Bacteriol.139:64-70.
- 139.-SKJOLD;D.H.EZEKIEL.(1982a).Analysis of lambda insertions in the fucose utilization region of Escherichia coli K-12.Use of fuc and argA transducing bacteriophages to

- partially order the fucose utilization genes. *J. Bacteriol.* 152:120-125.
- 140.-SKJOLD, A.C., D.H.EZEQUIEL. (1982b). Regulation of D-arabinose utilization in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol* 152:521-523.
- 141.-SOBENON, X., L.COVARRUBIAS, F.BOLIVAR. (1980). Constructions and characterization of New cloning vehicles. IV. Detection derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9:287-305.
- 142.-SRIDARA, S., T.T.WU. (1969). Purification and properties of lactaldehyde deshydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 244:5233-5238.
- 143.-SRIDARA, S., T.T.WU, T.M.CHUSED, E.C.C.LIN. (1969). Ferrous activated nicotinamide adenine dinucleotide linked dehydrogenase from mutant of *E. coli* capable of growth on 1,2 propanediol. *J. Bacteriol.* 93:87-95.
- 144.-ST.MARTIN, E.J. y R.P.MORTLOCK. (1976). Natural and altered induction of the L-fucose catabolic enzymes in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 127:91-97.
- 145.-STARLINGER, P. (1977). DNA rearrangements in procariots. *Ann. Rev. Genet.* 11:103-126.
- 145'.-STERNBERG, N., D.TIEMEIER y L.ENQUIST. (1977). In vitro packaging of a Dam vector containing EcoRI DNA fragments of *Escherichia coli* and phage P1. *Gene* 1:255-257.
- 146.-STOKER, N.G., J.M.PRATT y H.BARRY HOLLAND. (1984). In vivo Gene expression systems in prokaryotes. en *Transcription and Translation*. Editado por B.D.HAMES y S.J.HIGGINS. Pag. 154-172. IRL Press Ltd.

- 147.-SUSMAN,R.,F.JACOB.(1962) Sur un système de repression thermosensible chez le bacteriophage lambda.Escherichia coli. C.R.Ned.Sci.Wash. 254:1517-1519.
- 148.-SUSKIND,S.R. y L.I.KUREK.(1959) On a mechanism of suppressor gene regulation of tryptophan syntetase activity in Neurospora crassa. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S 45: 193-196.
- 149.-TAKAGI,Y. y H.SAWADA.(1964a) The metabolism of L-ramnose.Biochim.Biophys.Acta. 92:10-17.
- 150.-TAKAGI,Y. y H.SAWADA.(1964b).The metabolism of L-ramnose in Escherichia coli.Biochim.Biophys.Acta.92:18-25
- 151.-TAYLOR,A.L y C.D.TROTTER.(1967) Revised linkage map of Escherichia coli.Bacteril Rev. 31:332-353.
- 152.-TERRANCE,G.COOPER.(1977) Radiochemistry. En The tools of Biochemistry.Editado por J.WILEY y SONS Inc.USA.
- 153.-TICHY,H,(1975).Chromatography of dansyl-peptides from tryptic digests of electrophoretically separated proteins. Anal.Biochem.69:552-557.
- 156.-VOGEL,H.J.,(1963).Induction of acetylornithine -transaminase during pathway-wide repression.En Informational macromolecules.Editado por H.J.VOGEL,V.BRYSON y J.O.LAMPEN. Academic Press,New York,Pag.293-300
- 154.-TOUATI,D.(1983)Cloning and mapping of the manganese superoxide Dismutase Gene (SodA) of Escherichia coli K-12. J.Bacteriol. 155:1078-1087.
- 155.-TRUFFA BACHI,P.,N,GUIISO,G.N.COHEN,J.THEZE y B.BURR (1875) Evolution of biosynthetic pathways: Immunological approach.Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 72:1268-1271.

- 157.-VOGEL,H.J. y D.F.BACON.(1966) Gene aggregation: Evidence for a coming together of funcionally related, not closely linked genes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 55: 1456-1461
- 158.-WALSH,K.A.(1970).Trysinogens and trypsins of various species. en Methods in Enzymology. 19:41-48.
- 159.-WEISBERG,R.A.,S.ADHYA.(1977) Illegitimate recombination in bacteria and bacterophage. Ann.Rev.Genet.11:451-473.
- 160.-WILLIAMS BILL,G (1980) Bacteriophage lambda vectors for DNA cloning. Genetic Engineering vol.2. Principles and Methods.Editado por SETLOW y HOLLANDER. Plenum Press 201-229.
- 161.-WILSON,C.,D.PERRIN.,F.JACOB y J.MONOD.(1964) Non inducible mutants of the regulador gene in the "lactose" system of Scherichia coli. J.Mol.Biol.8:582-592.
- 162.-WILSON,D.M.,y S.AJL.,(1957a).Metabolism of L-rhamnose by Escherichia coli.I. L-Rhamnose Isomerase.J.Bacteriol.73:410-414.
- 163.-WILSON,D.M.,y S.AJL (1957b) Metabolism of L-rhamnose by Escherichia coli. II The phosphorylation of L-rhamnose, J.Bacteriol.73:415-420.
- 164.-Woo,s.(1979).A sensitive and rapid method for recombinant phage screening.Methods and Enzymology.68:389-396.
- 165.-WRIGHT,J.A y B.D.SANWAL.(1969) Regulatory mechanisms involving nicotinamide adenine nucleotides as allosteric effectors.II:Control of phosphoenol pyruvate carboxykinase.J.Biol.Chem.244:1838-1845.

- 166.-WU,T.T.(1978). Experimental evolution in bacteria
CRC Critical reviews in Microbiology.6:33-51.
- 167.-ZIPKAS,D.y M.RILEY.(1975).Proposal concerning mechanism evolution of the genome of E.coli. Proc.Natl. Acad.Sci.USA.72:1354-1358.
- 168.-ZISSLER,j.,E.SIGNER y F.SCHAEFER.(1971a) The role of recombination in growth of bacteriophage lambda I.The gamma gene en The bacteriophage lambda I.Editado por HERSHEY. Cold Spring Harbor laboratory, New York pp-455-468.
- 169.-ZISSLER,J.,E.SIGNER y F.SCHAEFER.(1971b).The role of recombination in growth of bacteriophage lambda II. Inhibition of growth bu prophage P2. en The bacteriophage lambda. Editado por A.D.HERSHEY. Cold Sping Harbor laboratory New York.pp.469-475.
- 170.-YANISCH-PERRIN,C.,J.VIEIRA y J. MESSING.(1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. Gene. 33. 103-119.
- 171.-YEN,W.K y L.N.ORNSTON (1980) Origins of metabolic diversity: Sbstitution of homologous sequences into genes for enzymes with different catalytic activities. Proc.Natl. Acad.Sci. USA.77:5365-5369.
- 172.-THOMAS,M y R.W.DAVIS(1975). Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease. J.Mol.Biol. 91 315-319.