

Genoma microbiano en clínica

Walter Ledermann D.¹

Resumen

El genoma microbiano comprende la secuencia completa de los genes de un microorganismo. Su conocimiento permite una mejor comprensión de la patogenia, con aplicaciones en la prevención, en el diagnóstico y en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Conocida la dinámica de los mecanismos de invasión, producción de toxinas, capacidad de adaptación a ecosistemas adversos y otras múltiples posibilidades de variación, pueden diseñarse nuevas vacunas más específicas, así como establecerse combinaciones interespecies, o utilizarse bacterias avirulentas de muy fácil cultivo para producir en forma industrial antígenos de gérmenes de crecimiento fastidioso. En el campo de los antibióticos, se abren perspectivas hacia líneas absolutamente distintas, con drogas capaces de bloquear determinados pasos en cadenas metabólicas vitales. Ya existen múltiples aplicaciones de la genética en diagnóstico microbiológico, con técnicas que indudablemente se irán simplificando y perfeccionando con el conocimiento de la entera secuencia del genoma bacteriano: hibridación, reacción de polimerasa en cadena, etc. Por último, el conocimiento del genoma también permitirá la utilización benéfica, a escala industrial, de algunos microorganismos en la producción de hormonas, vitaminas, aminoácidos y antibióticos.

(**Palabras clave:** microorganismo, gen, genética, vacunas.)

The microbial genome

The microbial genome is the complete sequence of all the microbial genes. Its knowledge permits a better understanding of the pathology caused by the organism, with applications in the prevention, diagnosis and treatment of infectious diseases. Understanding the dynamics of invasion mechanisms, toxin production, capacities to adapt to adverse ecosystems and other possibilities of variation could be used to design more specific vaccines and/or inter-species combinations. Furthermore using avirulent forms which can be easily cultivated on an industrial scale to produce antigens of bacteria with a more fastidious growth. In the field of antibiotics it opens the possibilities of new absolutely distinct lines of drugs capable of blocking determined vital metabolic chains. There already exists multiple applications of genetics in microbiological diagnosis, with techniques that undoubtedly will be simplified and perfected with the knowledge of the complete gene sequence, using hybridization, PCR, etc. Ultimately the knowledge of the genome permits the beneficial utilization on an industrial scale of some microbes in the production of hormones, vitamins, amino-acids and antibiotics.

(**Key words:** microorganism, gen, genetics, immunization.)

ANTECEDENTES

En toda guerra, un completo conocimiento del enemigo a derrotar otorga una ventaja indiscutible. En el perpetuo enfrentamiento de los médicos contra los microbios, término

este acuñado por un cirujano, el francés Sédillot y hoy considerado demasiado familiar por los microbiólogos, que en forma un tanto cursi prefieren el vocablo "microorganismo", el conocimiento de "estos seres mínimos que hoy alcanzan el máximo de la atención", como decía con desdén el célebre Virchow en el siglo XIX¹, es para nosotros materia de importancia trascendente. Nuestro afán de conocimiento nos llevó, sucesivamente, a desentrañar su estructura

1. Médico. Unidad de Infecciosos y Segunda Infancia, Hospital Luis Calvo Mackenna.

primero y a interiorizarnos en sus funciones después; hoy en día, el énfasis está puesto en el genoma mismo, esto es, en la base informática que regula la agresiva conducta de estos seres.

El ADN se había descubierto en 1869 y pasaría casi un siglo hasta que el microbiólogo canadiense Oswald Avery demostrara su función en la herencia, al identificarlo como la sustancia que transfería factores de virulencia de un neumoco a otro, confiriéndole agresividad². El gran salto siguiente lo darían James Watson y Francis Crick en 1953, con su mágico descubrimiento de la doble hélice del ADN humano³. De allí en adelante los pasos serían agigantados: la obra de Severo Ochoa ayudaría a comprender cómo se transmite la información de los genes a las enzimas, a través del ARN⁴; los franceses Francois Jacob y Jacques Monod volverían al ADN bacteriano, proponiendo en 1960 un modelo de genes actuando secuencialmente hacia una función⁵; la *Escherichia coli* K 12 se convertiría en la bacteria favorita para los genetistas bacterianos, por su gran receptividad, y el final no tardaría en llegar: en 1995 se conoció el primer genoma bacteriano completo, el de *Haemophilus influenzae*, seguido por los de *Mycoplasma genitalium*, *Methanococcus jannaschii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Synechocystis sp.* (cepa PCC 6803), *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, *Myxococcus xanthus*⁶.

Este año, *Vibrio cholerae* se agregaría a la lista con un novedoso fenómeno: dos cromosomas, de los cuales el mayor, de casi tres millones de pares de bases, contendría la información necesaria para el desarrollo de las funciones celulares esenciales (replicación, biosíntesis), así como para su patogenicidad (toxinas, adhesinas, antígenos de superficie); en tanto que el más pequeño de estos anillos de ADN "pudiera haber sido un megaplasmido capturado por un *Vibrio* ancestral": un buen punto de partida para entender cómo un organismo ambiental y de vida libre pudo en un momento emerger como patógeno⁷. Con esta bacteria, son ya treinta las especies microbianas cuyo genoma completo se ha develado en los últimos cinco años y, de acuerdo al ritmo de los trabajos en marcha, se espera que hacia el 2002 se tenga la información de un centenar de otras bacterias⁸.

GENOMA MICROBIANO

El término de genoma microbiano comprende el conjunto total de los elementos génicos, cromo y extracromosómicos. Estos últimos, contenidos en los plasmidios codifican generalmente para factores de virulencia y son transferibles, lo cual los convierte en elementos temibles.

El conocimiento del genoma microbiano permite, fundamentalmente, una mejor comprensión de la patogenia, con aplicaciones en la prevención, en el diagnóstico y en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La disponibilidad de las secuencias completas del genoma ha sido una revolución en el estudio de los mecanismos de virulencia, fundamentalmente⁹. En forma secundaria, facilita el aprovechamiento industrial de genes microbianos en la producción de aminoácidos, vitaminas y antibióticos, concediendo a algunas bacterias un carácter de "ganado" útil, por similitud con vacas lecheras y ovejas laneras.

Si quisiéramos referirnos solo a sus aplicaciones médicas, podríamos resumirlas en cinco rubros (tabla 1).

CONOCIMIENTO DEL GENOMA COMO HERRAMIENTA PARA ENTENDER LA PATOGENIA

Shigella flexneri proporciona un buen modelo para ilustrar cómo el conocimiento del genoma nos enseña a comprender la patogenia y elaborar estrategias de contención¹⁰. En esta especie, todos los mecanismos de adherencia y penetración a las células del epitelio intestinal están codificados en un elemento extracromosómico, un plasmidio de 220 kilobases, similar a otros plasmidios encontrados en otras especies del género *Shigella*.

De este plasmidio, un fragmento de solo 30 kilobases contiene todos los genes que codifican para la invasión, dividido en dos locus para dos tipos de proteínas. El locus mxi-spa posee 20 genes que son responsables de la elaboración de unas 15 proteínas bacterianas utilizadas en el proceso invasor. Ahora bien, partículas de látex envueltas en algunas de estas proteínas son internadas por la célula huésped, como si fueran *Shigella*. Surgen aquí alternativas interesantes, como estos genes para producir antígenos inmunizantes que desencadenen anticuer-

Tabla 1

Aplicaciones del conocimiento del genoma microbiano en clínica

Mejor comprensión de la patogenicidad	Mecanismos de invasión Determinación de toxinas Capacidad de variación Probable anticipación de epidemias
Diseño de vacunas	Antígenos esenciales Combinación interespecies Bacterias avirulentas como carriers Rediseño por reordenamiento
Desarrollo de antimicrobianos	Anticipación de resistencia Determinación de proteínas blanco "Nuevos": bloqueo función vital bloqueo de transcripción
Diagnóstico más preciso	Hibridación Polimerasa en cadena Perfil plasmidial Electroforesis de campo pulsado Otras
Producción farmacéutica	Aminoácidos Vitaminas Antibióticos Otros

pos protectores contra la invasión o, quizás, la elaboración de anticuerpos monoclonales con acción terapéutica o, por último, utilizar estas proteínas invasoras para desarrollar un test diagnóstico.

Como todos estos genes responsables de los mecanismos de invasión están en un elemento extracromosómico y, por tanto, transferible, pueden insertarse en una bacteria más fácil de cultivar, más "doméstica", por así decirlo; en suma, ganado bacteriano.

Una vez que *Shigella flexneri* ha penetrado en la célula huésped, queda englobada en una vacuola. Cómo sale de allí esta bacteria inmóvil, desprovista de flagelos, resulta fascinante: se fabrica una cola de actina, proteína que cosecha de la célula huésped, y se desplaza como un verdadero cohete, a la velocidad de 60 micrones por minuto. Para realizar esta maravillosa hazaña necesita formar la proteína IcsaA o VirG. Esta proteína de membrana externa protruye a la superficie y polimeriza la actina, que se va trenzando hasta formar una cola, en un polo de la bacteria.

Ahora bien, si uno logra insertar los genes IcsaA de *S. flexneri* en la bondadosa *Escherichia coli* K 12 –bondadosa, porque acepta cualquier manipulación genética— esta cepa, de una especie claramente distinta, es capaz de formar las mismas colas de actina. Se ha pensado, de inmediato, que una mutante avirulenta de *S. flexneri*, a la que se la ha arrancado, por delección los genes IcsaA, sería una excelente candidata para vacuna. Imaginemos una vacuna viva, en que *Shigella* logra penetrar en la célula, generando en las primeras etapas de invasión buenos anticuerpos protectores, y cuya multiplicación no entraña ningún peligro, pues no puede salir de la vacuola mortal en que ella misma se ha metido.

Descifrado el genoma de una especie, el progreso en la comprensión de su relación con su huésped, en nuestro caso el hombre, se desenvuelve a una velocidad fantástica. Hace dos años le tocó el turno a *Borrelia burgdorferi* y ya sabemos bastante más acerca de los mecanismos que esta bacteria emplea para evitar su eliminación y persistir en

el huésped, así como sobre su variación antigénica, fundamental al momento de discutir el rediseño de vacunas¹¹.

El conocimiento del genoma completo puede llevar a desarrollar vacunas "distintas"

La estrategia seguida en los últimos años para desarrollar nuevas vacunas bacterianas se ha centrado en identificar estructuras externas que puedan servir como antígenos, básicamente polisacáridos capsulares o proteínas de membrana externa. En el caso específico de *Streptococcus pneumoniae*, cuya resistencia a betalactámicos se extiende cada día más, se ha pretendido controlar esta amenaza a través de la prevención, esto es, proponiendo la vacunación rutinaria de los lactantes.

Interesante estrategia ... pero primero se necesita la vacuna. Por supuesto, la tentación ha sido siempre utilizar los antígenos capsulares, ya que la cápsula, a más de ser el elemento más externo, es también su gran elemento de virulencia. Pero la constitución íntima de la cápsula es variable y se ha topado con la existencia de numerosos serotipos, desigualmente distribuidos en las distintas regiones geográficas, forzando a los investigadores a difíciles elecciones de siete, once o más serotipos, y llegando a pensar en "vacunas regionales". Seductora es la idea de llegar a conocer el entero genoma del neumococo, entender así por completo también su patogenia y encontrar el talón de Aquiles de su agresividad, la vía metabólica común a todos los serotipos e interrumpirla con una vacuna.

Volvemos al ejemplo de *Shigella flexneri*, de la cual se conocen unas 15 proteínas involucradas en el mecanismo invasor: quizás bastaría una vacuna que generara anticuerpos contra una sola de ellas para detener la agresividad de la bacteria. La clave está en llegar a conocer cuál es el punto básico –y por lo tanto débil– en el proceso agresor del neumococo.

Recién se completa la secuencia génica de *Chlamydia tracomatis* y *Chlamydia pneumoniae*, de las cuales no estaban claros los antígenos que podrían desencadenar una respuesta protectora para ser empleados como vacunas. Ahora habrá que identificarlos y la tarea será larga: el conocimiento del genoma es solo un principio¹².

El otro aspecto es la construcción de vacunas híbridas, como las que un tiempo se ensayaron, en que un *Salmonella typhi*, portadora de sus propios antígenos inmunizantes, aceptaba una secuencia génica de *Shigella dysenteriae*, sirviendo como vacuna mixta anti *Salmonella* - *Shigella*. Conocido el genoma de todas las bacterias patógenas, meta que indudablemente se alcanzará más tarde o más temprano, se puede soñar en una vacuna oral en base a una bacteria avirulenta, quizás la bondadosa *Escherichia coli* K 12, cargada de las secuencias génicas esenciales para inmunizar contra la tifoidea, el cólera, la disentería y algo más. De hecho, el conocimiento del genoma entero de una cepa virulenta de meningococo B (cepa MC 58) ha permitido ensayar 350 antígenos candidatos para vacunas, insertando los genes responsables en una complaciente *Escherichia coli*, la cual los ha producido en cantidad suficiente para purificarlos, inmunizar ratones con ellos y medir la respuesta serológica, propiedad conocidamente correlacionada con la eficacia de una vacuna en el hombre¹³.

Por último, el conocimiento del genoma podría ayudar a mejorar vacunas conocidas. Estudios comparativos de los genomas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y la cepa BCG, plantean la posibilidad de efectuar hibridaciones y reordenamientos génicos, a fin de obtener una BCG más efectiva¹⁴.

Conocimiento del genoma proporciona información para desarrollar nuevos antibióticos

El conocimiento del completo genoma bacteriano ha provocado no pocas sorpresas, una de ellas es que cerca de un tercio de las secuencias génicas identificadas no corresponden a ninguna función conocida, suponiéndose que estos genes intervienen en algunos procesos metabólicos o de compartimentalización, largo término que significa, en esencia, la capacidad de la bacteria para construirse envolturas. Hasta ahora los distintos grupos de antibióticos van, bien contra la síntesis de pared bacteriana, bien contra determinadas líneas metabólicas: fascinante aparece la idea de buscar nuevos "blancos", que permitieran desarrollar grupos de verdaderamente "nuevos" antibióticos, destinados a bloquear funciones vitales

determinadas por genes recientemente conocidos, o bien, si podemos soñar, a bloquear la transcripción de estos genes mismos.

Este aspecto es de importancia capital al momento de enfrentar bacterias casi "intra-tratables". Al completarse el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, se abre una esperanza para combatir la emergente epidemia de cepas multirresistentes. El desafío —y a la vez la esperanza— para los próximos años es trasladar esta información génica en ensayos realistas, blancos válidos y drogas "candidatos" para ensayos preclínicos. En general, podemos esperar que la próxima generación de drogas anti TBC esté constituida por moléculas pequeñas, relativamente hidrofílicas y con un fuerte anclaje a blancos celulares específicos, las que se obtendrían combinando técnicas de expresión génica con la química combinatoria¹⁵.

Retornando a *Shigella flexneri* vimos cómo un pequeño fragmento del genoma, un plasmidio de 30 kilobase —teóricamente transmisible— contiene la información para el proceso de invasión. En otras especies también se encuentran estas verdaderas "islas" de patogenicidad, que pueden haberse adquirido de otra especie por conjugación o por fagos; en esta última situación pueden incorporarse al genoma como profagos y conferir poder patógeno, como ocurre en el clásico ejemplo del bacilo diftérico. Estos profagos cobran importancia con la información obtenida al develar el genoma completo de *Bacillus subtilis*¹⁶, al cual se le conocían hasta entonces tres profagos. Ahora se vio que este bacilo contenía al menos diez de estos elementos, de alguna manera relacionados con genes que codifican para protegerse de metabolitos tóxicos. Uno se pregunta si no podrían desarrollarse originales antibióticos dirigidos a estos profagos y dejar a estas bacterias indefensas. Un antibiótico que destruyese específicamente el "islote de invasión" de *Shigella flexneri*, mantendría a esta bacteria viva, pero incapaz de invadir nuestro epitelio intestinal.

Pseudomonas aeruginosa, una de las tres principales causas de infecciones oportunistas, tiene el mayor de los genomas secuenciados, con más de seis millones de pares de bases, lo que contribuye a explicar su tremenda adaptabilidad a distintos ambientes y su capacidad de adquirir resistencia a una variedad de antimicrobianos. Contiene la más alta proporción de genes reguladores

y de aquellos involucrados en catabolismo, transporte y eflujo de compuestos orgánicos, así como nada menos que cuatro sistemas potenciales de quimiotaxis. En suma, un número enorme de posibles "blancos" para nuevos antibióticos, pero dando vuelta la moneda, un número enorme también de posibles mecanismos de resistencia¹⁷. Dicho en términos simples, es el mayor de los monstruos conocidos en bacteriología, un adversario tenaz y una amenaza permanente.

Un aporte adicional del genoma bacteriano enteramente secuenciado es la comprensión de los mecanismos de diseminación de resistencia. Los transposones, estos inquietos elementos que se mueven de una especie bacteriana a otra, son de especial relevancia en las bacterias Gram negativas facultativas, como las Enterobacteriaceae. El más célebre, el Tn21 (extraordinariamente ágil), encabeza una verdadera familia de transposones estrechamente relacionados, cuya capacidad nefasta reside en un segmento de ADN móvil, llamado integron, que codifica para la habilitación de un sitio específico para adquirir o atrapar genes portadores de resistencia a múltiples antibióticos¹⁸. De esta manera, los integrones representan el mecanismo primario para capturar genes de resistencia y diseminarlos entre las bacterias Gram negativas. Las malas noticias son que ya se han detectado "super" integrones, que codifican para funciones que van más allá de la resistencia y de la patogenicidad, uno de ellos en *Vibrio cholerae*¹⁹.

Utilización del genoma en el diagnóstico de laboratorio

Numerosas técnicas se habían desarrollado antes de identificar el primer genoma bacteriano completo en 1995, utilizando segmentos del mismo, como ocurre con la hibridación, la electroforesis de campo pulsado y la reacción en cadena de polimerasa, para citar los más célebres, o bien, los elementos extracromosómicos, como el perfil plasmidial, que permite determinar la identidad de una cepa en un brote intrahospitalario y trazar la secuencia del mismo.

El conocimiento del genoma completo permitirá seleccionar los segmentos más apropiados para diferenciar especies, serogrupos y serotipos, y quizás antes de lo pensado, las aglutinaciones y precipitaciones en

lámina serán un recuerdo en los laboratorios microbiológicos, y luego los tubos de caldo, los agares, los azúcares y el bello mundo pasteuriano.

El conocimiento del genoma aplicado a la producción biológica

Pongamos los microbios a trabajar para nosotros. Cada uno de estos minúsculos organismos puede ser una fábrica. De hecho, levaduras y otros hongos ya son utilizados a larga mano en procesos industriales, en enormes tanques de fermentación, para producir antibióticos, vitaminas y aminoácidos. La célebre *Escherichia coli* K 12 ha servido para producir gamma interferon, al incrustar en su genoma genes de ADN humano que codifican para su producción²⁰.

Hasta ahora, mediante selección cuidadosa de mutaciones, se han ido obteniendo cepas más "rendidoras", con mayor velocidad de crecimiento, lo que ha permitido acortar los ciclos de fermentación. En la industria el tiempo es oro y la tentación surge de inmediato para hacer sobre el genoma una intervención más radical y lograr todavía una mayor productividad y eficiencia. El cómo hacerlo requiere un conocimiento cabal del genoma completo, para poder eliminar genes destinados a funciones microbianas no vitales, superfluas (para nosotros), que pudieran distraer al microorganismo de nuestros intereses. Si queremos que el *Penicillium* genere con facilidad la penicilina, saquémosle algunos genes codificadores para funciones que puedan desviarlos de tan noble (para nosotros otra vez) propósito: para decirlo en términos claros y en una analogía comprensible, castremos al toro y tendremos un buey eficiente.

La primera "poda" podría dirigirse hacia los profagos que suelen encontrarse en el genoma, esto es, el legado genético de invasores virales –los bacteriófagos– que en su momento se integraron al genoma como una fuerza dormida. El más célebre de estos elementos adquiridos es el ya mencionado profago beta de *Corynebacterium diphtheriae*, un virus "dormido" en medio del genoma bacteriano, que dirige la producción de la toxina diftérica: en una época pretérita, este bacteriófago convirtió a un benévolo bacilo en una criminal amenaza para la humanidad. Para el bacilo de Klebs y Loeffler esta función toxigénica no es importante;

podemos suponer entonces que, en otros bacilos, otros profagos adquiridos en generaciones pasadas y ya incorporados al patrimonio genético, están desviando el metabolismo bacteriano hacia funciones inútiles. Suprimamos estos advenedizos, que al ser inducidos a actuar pueden llevar a la lisis del cultivo, y concentremos la energía bacteriana toda en nuestros propios fines.

Sin embargo, debe procederse con mucha cautela, pues recientes evidencias sugieren que la longitud de las secuencias entre los genes "útiles" puede ser importante *per se*, porque hay un complejo enlace, al menos en bacterias que están en su fase de crecimiento rápido, entre la organización del genoma mismo y la arquitectura general del cuerpo microbiano, de modo que al suprimir una secuencia que nos parece inútil, podemos derrumbar todo el edificio²¹.

Por otra parte, el conocimiento del genoma entero puede facilitarnos la comprensión de complejas vías metabólicas. A través de estas vías, moléculas difíciles o caras de obtener por procedimientos químicos, podrían sintetizarse a bajo costo y en mayor volumen, utilizando enzimas identificadas en los procesos de secuenciación de genes. Podrían crearse microorganismos artificiales, especialmente adaptados a particulares situaciones y funciones. Volvamos al bacilo diftérico y supongamos que queremos mejorar el rendimiento en la producción del toxoide usado como vacuna; supongamos luego que extraemos del genoma el profago beta y lo introducimos –y esto es la ingeniería genética– en el genoma de una bacteria o de un hongo de crecimiento más fácil y más rápido. Y si un bacteriólogo me dice que el *Corynebacterium diphtheriae* crece fácil, no ha visto "caerse" en una noche el velo de crecimiento en 300 placas Roux y perderse de golpe toda la cosecha.

Bacillus subtilis, cuyo genoma se develó en 1997, presenta un ejemplo fascinante²². En él, la presencia de varias vías de producción antibiótico, producción sin duda destinada a defender su nicho ecológico, ocupa solo el 2% del genoma total, en tanto que 42% corresponde a genes de función desconocida. En nuestro mundo bélico, resulta sorprendente que solo 2% del presupuesto genético esté destinado a la defensa y tendemos a suponer que debe ser mayor. De hecho, gran parte del genoma de este bacilo está destinado a múltiples sistemas de

transporte proteico, sistemas de bomba vitales, que usan energía de la hidrólisis del ATP para incorporar nutrientes, pero también para expulsar metabolitos tóxicos y sustancias nocivas, que pudieran ensayarse como antibióticos¹⁶.

Soñando un poco: Francis Crick y la teoría de la panspermia

No podemos extraer del conocimiento del genoma microbiano nada más de lo que allí está textualmente escrito. La secuenciación completa del mencionado *Bacillus subtilis* terminó con una hermosa teoría. En una conferencia en la Universidad de Harvard en los años setenta, Francis Crick (sí, el mismo que con James Watson describiera la doble hélice del ADN) declaró su desencanto con la idea que la vida hubiera nacido en nuestro planeta. Expuso entonces su teoría de la panspermia, según la cual la semilla de la vida podría haber sido una extraordinariamente resistente espora bacteriana, "de la clase producida por *Bacillus subtilis* y bacterias relacionadas". En respuesta, Matthew Meselson señaló que, de ser así, con seguridad una civilización extraterrestre habría mandado un mensaje en la espora y la humanidad tendría la posibilidad única de conocer el secreto del universo a través de la secuencia de nucleótidos del genoma contemporáneo del bacilo esporulado. Y en respuesta a esta afirmación, dicen James Hoch y Richard Losick, que ya se ha publicado la secuencia de cuatro millones doscientos catorce mil ochocientos diez nucleótidos del cromosoma único del *Bacillus subtilis*, y que si allí había un mensaje cósmico, este ha escapado a la perspicacia de los 151 científicos que llevaron a cabo esta impresionante secuenciación²².

Pero queda el 42% de genes de función desconocida, que si todavía no puede decirnos nada, nos permite soñar.

REFERENCIAS

1. Koch R: La etiología de la tuberculosis y otros trabajos. Ed. Universitaria, Buenos Aires 1965: 22.
2. Avery OT, Dubos R: Protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus in mice. J Exp Med 1931; 54: 73-9.
3. Watson JD, Crick FH: Genetical implication of the structure of DNA. Nature 1953; 171: 964-5.
4. Ochoa S: The chemical basis of heredity. Experientia 1964; 20: 57.
5. Jacob F, Monod J: On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol 1961; 26: 193-9.
6. Blattner FR, Plunkett GIII, Bloch CA, et al: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K 12. Science 1997; 277: 1453-62.
7. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, et al: DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature 2000; 406: 477-83.
8. Fraser CM, Eisen JA, Salzberg SL: Microbial genome sequencing. Nature 2000; 406: 799-803.
9. Hood DW: The utility of complete genome sequences in the study of pathogenic bacteria. Parasitology 1999; 118 (Suppl.): 3-9.
10. Sansonetti P, Tran Van Nhieu, Egile C: Rupture of the intestinal barrier and mucosal invasion by *Shigella flexneri*. CID 1999; 28: 466-75.
11. Nordstrand A, Barbour AG, Bergstrom S: Borrelia pathogenesis research in the post-genomic and post-vaccine era. Curr Opin Microbiol 2000; 3: 86-92.
12. Stephens RS: Chlamydial genomics vaccine antigen discovery. J Infect Dis 2000; 181 (Suppl. 3): 521-3.
13. Pizza M, Scarlato V, Masignani A, et al: Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science 2000; 287: 1816-20.
14. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al: Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 1999; 284: 1520-3.
15. Barry CE 3rd, Slayden RA, Sampson AE, Lee RE: Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. Biochem Pharmacol 2000; 59: 221-31.
16. Kunst F, et al: *Bacillus subtilis* genoma. Nature 1997; 390: 249-56.
17. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA 01, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406: 959-64.
18. Liebert CA, Hall RM, Summers AO: Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 507-22.
19. Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D: Super-integrations. Res Microbiol 1999; 150: 641-51.
20. Danchin A, Glaser P, Kunst F: A dynamic gallery. The practical value of microbial genomics. Odyssey 1998; 4: 16-20.
21. Strauss B: The stability of the genome and the genetic instability of tumors. Persp Biol Med 2000; 43: 286-300.
22. Hoch JA, Losick R: Panspermia, spores and the *Bacillus subtilis* genoma. Nature 1997; 390: 237-8.