

Aislamiento y caracterización de vcp1, un nuevo fago filamentoso de *vibrio cholerae* O139

Javier Campos, Eriel Martínez, Edith Suzarte, Karen Marrero, Boris Rodríguez, Yussuan Silva, Talena Ledón y Rafael Fando.

Departamento de Genética. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Avenida 25 esquina A 158, Reparto Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. Telef. 2718066 Ext. 248. e-mail: Javier@biocnic.cneuro.edu.cu

Recibido: 27 de noviembre de 2002

Aceptado: 13 de diciembre de 2002

Palabras clave: *Vibrio Cholerae*, VCP1, fago filamentoso, aislamiento, caracterización.
Key words: *Vibrio Cholerae*, VCP1, filamentous phage, isolation, characterization.

RESUMEN: Un nuevo bacteriófago, designado VCP1, fue aislado de la cepa SG25-1 de *V. cholerae* O139 y posteriormente caracterizado. Las partículas purificadas del fago tienen morfología filamentosa al microscopio electrónico. La secuencia nucleotídica de su genoma, de 7543 nucleótidos, revela una organización genética característica de otros fagos filamentosos como los del grupo Ff en *Escherichia coli* y CTX ϕ , fs1 y VSK en *V. cholerae*. Sin embargo, VCP1 al igual que otros fagos filamentosos de *V. cholerae* no presenta homólogos del gen IV (porina pIV) de los fagos del grupo Ff. En esa región, equivalente a la región donde CTX ϕ porta los genes de la toxina del cólera, VCP1 exhibe una zona distintiva de 775 nucleótidos de función y origen desconocidos, para los cuales no existen secuencias homólogas en las bases de datos internacionales. Dicha región contiene un ORF hipotético, mientras el resto del genoma tiene doce marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *open reading frames*). *V. cholerae*, infestado con VCP1, expresa altos niveles del producto proteico del ORF112, que es altamente homólogo a proteínas de unión a ADN de simple cadena, necesarias para la replicación y ensamblado de fagos filamentosos. La descripción de este nuevo fago filamentoso en *V. cholerae*, permitirá estudiar su aporte a la patogénesis molecular del cólera y a la transmisión horizontal de genes.

ABSTRACT: We found a novel filamentous phage, designated VCP1, in strain SG25-1 of *Vibrio cholerae* O139. The 7543 bases nucleotide sequence of the phage genome was determined. The analysis of the nucleotide sequence revealed that VCP1 had a distinctive region of 775 nucleotides with an unknown origin and function which did not show homology with any entry in the databases, and a conserved region with similar overall genomic organization to that of CTX ϕ , fs1 and VSK phages of *Vibrio cholerae* and to phages of Ff group of *Escherichia coli*. Twelve open reading frames (ORFs) homologous to previously reported peptides of other filamentous phages were identified. As for CTX ϕ , no homologous ORF to gene IV of the coliphages Ff is present in VCP1. The product encoded by ORF112 was identified by mass spectrometry and amino terminal sequencing and showed homology with single stranded DNA binding proteins from previously characterized filamentous phages. The

identification of this phage in *V. cholerae* will allow us to study its contribution to the pathogenic process and to the horizontal transmission of genetic information between bacterial populations.

INTRODUCCIÓN

Los fagos filamentosos son virus bacterianos pertenecientes al género *Inovirus* de la familia *Inoviridae*. Sus hospederos son generalmente bacterias Gram-negativas aunque recientemente fue aislado un fago filamentosos de *Propionibacterium freudenreichii*, una bacteria Gram-positiva.¹ A diferencia de la mayoría de los virus bacterianos descritos, los fagos filamentosos no lisan a su hospedero, sino que ensamblan sus partículas virales en la membrana citoplasmática bacteriana y las exportan al medio extracelular en un proceso continuo, cuyo resultado no es la muerte bacteriana. Los fagos filamentosos son excretados en cantidades variables, desde una partícula de fago por célula por hora en el caso del fago CTX ϕ de *Vibrio cholerae*, hasta cientos de partículas por célula por hora en el caso de los fagos del grupo Ff (f1, Fd y M13) de *Escherichia coli*.^{2,3} Sus partículas son filamentos flexibles cuya longitud oscila entre 800 y 2000 nm, dependiendo del fago, y su grosor

promedio es de 6 nm.² Cada filamento está formado por una cubierta tubular proteica que acomoda en su interior al genoma, consistente en un ADN circular de simple cadena (ADNsc) que al infestar la bacteria hospedera es convertido en ADN de doble cadena, su forma replicativa (FR).^{2, 3} El receptor de los fagos filamentosos en la superficie de la bacteria son las fimbrias tipo IV como la fimbria sexual F en el caso de *Escherichia coli* y los fagos del grupo Ff.^{2, 3} Las partículas virales se unen a su receptor específico y son internalizadas a través de la membrana en un proceso que necesita del complejo *tolQRA* para liberar su ADN genómico en el citoplasma celular.^{4,5} La organización genómica de estos fagos refleja una relación funcional, los genes cuyos productos proteicos participan en el proceso de replicación, los genes que codifican las proteínas necesarias para el ensamblado y los que codifican las proteínas estructurales, se encuentran agrupados en zonas diferentes de su ADN.^{6,7}

Los fagos filamentosos, así como otros elementos genéticos accesorios (plasmidios, islas patogénicas, transposones) codifican frecuentemente factores de virulencia bacterianos que tienen marcado efecto en la infección y la enfermedad.⁸ Se considera que estos elementos genéticos se mueven horizontalmente entre cepas y especies diferentes y verticalmente dentro de la misma cepa o especie a través de las poblaciones bacterianas.⁸ En *V. cholerae*, agente causal de la enfermedad diarreica aguda del cólera,^{9, 10} los genes que codifican la toxina colérica, el principal factor de virulencia de la bacteria, se encuentran formando parte del genoma de un bacteriófago filamentosos temperado, denominado CTX ϕ .¹¹ En el genoma de CTX ϕ se encuentran otros genes cuyos productos proteicos además de ser importantes para el ensamblado y la estructura del fago, contribuyen a la virulencia bacteriana como toxinas (zot y ace) y (o) factores de colonización (cep).^{12,13} Eventualmente, el genoma de CTX ϕ se

escinde del cromosoma de *V. cholerae* y da lugar a partículas infectivas, posibilitando la transmisión horizontal de genes de virulencia desde cepas toxigénicas hacia cepas no toxigénicas.¹¹ Además de CTX ϕ , recientemente han sido descritos otros fagos filamentosos aislados de *V. cholerae*, VSK, fs1, fs2 y 493.¹⁴⁻¹⁷ de los cuales aún no se conoce si codifican factores de virulencia adicionales. VSK comparte un 87% de homología con fs1 y su genoma tiene hibridación cruzada con 493 lo que sugiere que han evolucionado a partir de un ancestro común.

El objetivo central de nuestro estudio fue realizar la caracterización molecular de VCP1, basados en la hipótesis de que este era un nuevo fago de la cepa toxigénica de *V. cholerae* SG25-1. Otros objetivos estuvieron encaminados a encontrar las relaciones genéticas de VCP1 con otros fagos de *V. cholerae* y *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivo. La cepa *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac proAB)*) fue utilizada para la propagación de plasmidios recombinantes. *V. cholerae* SG25-1, serotipo O139 (Calcuta, India, 1993), fue utilizada como donante del fago VCP1, y *V. cholerae* 569B (Serotipo O1, biotipo clásico, serotipo Inaba) fue utilizada como receptora de VCP1. El plasmidio pUC19 fue utilizado como vector de la clonación para los fragmentos de VCP1.¹⁸ El medio de cultivo utilizado fue Luria-Bertani (LB) (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0.5 % y cloruro de sodio 1 %). Opcionalmente se añadió agar al 1.5 % para preparar medio sólido. Los medios fueron suplementados cuando fue necesario con antibióticos a las concentraciones siguientes: ampicilina, 100 μ g/ml y polimixina B (P), 100 U/ml. Los componentes de los medios de cultivo fueron comprados de Oxoid.

Enzimas y reactivos. Las enzimas de modificación restricción,

polimerasas y nucleasas utilizadas en este trabajo fueron adquiridas de las firmas Boehringer Mannheim, Amersham y (o) Promega y fueron utilizadas de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Los reactivos empleados fueron adquiridos de *Merck*, *Sigma* y (o) *Promega*.

Purificación de ADN plasmídico y fragmentos. La purificación de ADN plasmídico se realizó utilizando los sistemas *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification system* y *Wizard[®] Plus Midipreps DNA purification System*, ambos de *Promega*. La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa al 0.8 % (m/v), en presencia de bromuro de etidio (1 μ g/ml) para visualizar el ADN en electroforesis convencionales o en presencia de naranja de acridina (1 μ g/ml) para distinguir ADN de simple cadena de ADN de doble cadena. La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el sistema *GFX[™] PCR DNA and gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech), teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

Secuenciación del genoma. La secuencia nucleotídica de VCP1 fue realizada a partir de fragmentos contiguos de VCP1 clonados en pUC19, utilizando los oligonucleótidos universales directo y reverso, ggtaacgccagggtttcc y ggaattgtgagcggataaca, respectivamente. Los fragmentos resistentes a la clonación fueron secuenciados directamente del ADN de simple cadena (ADNsc) del fago utilizando los siguientes oligonucleótidos: caagtcgagacgaactaacg, ccaagtaatacggataaacgc, cggcatttggggatcag, cggcctatggtaaaagtgc, tctctggtatcaccgatgcg, y gcgcttctccgtgtcctc.

La secuenciación se realizó de modo automático por el método de Sanger,¹⁹ utilizando un secuenciador automático *ALFexpress II DNA Analysis System*. Las secuencias obtenidas fueron empalmadas y analizadas usando los programas *ALFwin Sequence Analyzer* versión 2.10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweeden), *Redasoft Visual*

Cloning 2000 (Whitehead Institute for Biomedical Research), *Vector NTI 6000* (Informas, Inc) y *Gene Runner* versión 3.05 (Hasting Software, Inc). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos disponibles en *Internet* utilizando el programa Blast.

Southern blot. La técnica de hibridación *Southern blot* se realizó esencialmente según Sambrook y col.¹⁰ El ADN fue digerido con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos resultantes separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Estos fragmentos fueron transferidos a una membrana tipo Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo un procedimiento de transferencia alcalina por capilaridad descendente.²¹ El ADN adherido a las membranas fue estudiado con sondas de hibridación marcadas con el sistema no radioactivo *DIG labelling and detection Kit* (Boehringer Mannheim). La manchas de hibridación fueron reveladas mediante un anticuerpo específico conjugado a fosfatasa alcalina y una reacción cromogénica.

Transformación bacteriana. La electroporación de cepas de *Escherichia coli* con ADN plasmídico se hizo mediante el procedimiento de transformación descrito por Dower y col.,²² utilizando un voltaje de 2.5 kV en cubetas de 2 mm de separación entre electrodos.

Electroforesis desnaturante en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE). Las electroforesis de proteínas se realizaron esencialmente según Laemmli,²³ utilizando geles de por ciento adecuado. Los geles fueron revelados con azul Coomassie.²⁴

Purificación de partículas virales. Fue realizada partiendo de 100 ml de un cultivo infestado con VCP1. La biomasa bacteriana fue sedimentada por centrifugación a 8000 x g durante 10 min. Posteriormente el sobrenadante fue filtrado a través de membranas de 0.22 µm. Las partículas presentes en el filtrado fueron precipitadas por

centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos, luego de la adición de polietilenglicol 6000 al 5 % y NaCl al 3 % e incubación en hielo por 30 minutos. El precipitado con las partículas virales fue redisoluto en 1ml de salina amortiguada con fosfato (PBS).

Purificación del genoma ADNsc del fago. El genoma de VCP1 fue purificado a partir de las partículas virales usando una extracción con fenol - cloroformo según Sambrook et al 1989.²⁰

Ensayo de infección. La cepa donante fue cultivada hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm igual a 2.0. Una alícuota del cultivo fue filtrada por membranas de 0.22 µm para eliminar las bacterias. El filtrado se chequeó sembrando una alícuota de 50 µl en placa de LB sólido e incubando a 37°C toda la noche para comprobar su esterilidad por ausencia de unidades formadoras de colonias. Se usaron 200 µl del sobrenadante libre de células, o diluciones del mismo, para infectar 20 µl de un cultivo fresco de la cepa usada como receptora. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Seguidamente, las células fueron esparcidas en medio LB sólido o líquido según convino y se dejaron crecer a 37°C durante una noche. La infección fue chequeada estudiando la presencia de FR y ADNsc genómico de VCP1 en la cultivos resultantes de células infectadas.

Titulación del fago. Se procedió como en la sección anterior, solo que las células infectadas con diluciones del sobrenadante a titular fueron inoculadas en una capa de agar suave sobre placas de LB sólido. Las placas sembradas se incubaron toda la noche a 37°C y las placas opacas (focos de infección) observadas fueron contadas.

Microscopía electrónica. Diferentes cantidades de partículas purificadas de VCP1 fueron teñidas negativamente con una solución de acetato de uranilo al 4 % (m/v) y observadas sobre una rejilla Formvar cubierta de carbono en un microscopio electrónico de transmisión con un aumento de 50000 veces.

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Para la identificación de proteínas por espectrometría de masas fueron contratados los servicios del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro de masas híbrido con geometría octogonal QTOF-2 (*Micromass*, UK) equipado con una fuente de ionización nanospray. El software de procesamiento de los espectros de masas empleado fue el *MassLinx* versión 3.5 (*Micromass*, UK). La identificación de proteínas en las bases de datos se realizó utilizando tres programas que se basan en principios diferentes:

ProFound, *PepSea*, y *MASCOT* (<http://www.proteometrics.com/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del fago VCP1 y caracterización de su genoma. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio a la cepa *Vibrio cholerae* SG25-1 (serotipo O139) habían mostrado la presencia de un elemento extracromosomal en preparaciones de su ADN total. Comúnmente los elementos extracromosomales en bacterias patógenas corresponden a plasmidios o bacteriófagos que codifican factores de virulencia. SG25-1 es una cepa virulenta que fue manipulada en Cuba para obtener candidatos vacunales O139 mediante atenuación genética, por lo que resultó de interés conocer que codificaba este elemento genético. Se trabajó con la hipótesis de que constituía la forma replicativa de un fago. Experimentos de transducción de material genético demostraron que el sobrenadante de cultivo de la cepa donante SG25-1, desprovisto de las bacterias donantes mediante filtración (0.22 µm), permitía infectar la cepa receptora *V. cholerae* 569B con un elemento extracromosomal similar (Fig. 1). El análisis de restricción de este elemento extracromosomal con diferentes enzimas produjo un patrón de bandeos electroforético idéntico al del plasmidio de la cepa

donante (no mostrado), indicando que el elemento extracromosomal se transducía entre cepas de *V. cholerae* y sugiriendo que

correspondía a la forma replicativa del genoma de un bacteriófago excretado por la bacteria al cultivo. A su vez, el sobrenadante de la cepa

recién infectada transducía un elemento genético similar hacia otros cultivos vírgenes de 569B.

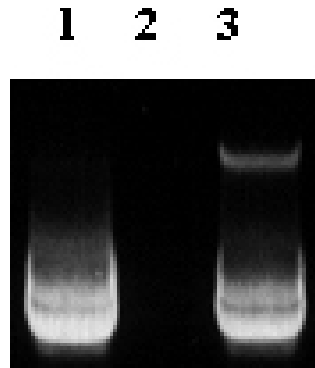


Fig. 1. Preparación de ADN plasmídico de las cepas de *V. cholerae* 1) SG25-1, 2) 569B y 3) 569B infectada con sobrenadante de SG25-1.

Mediante un procedimiento general de purificación y precipitación de bacteriófagos con cloruro de sodio y PEG (Materiales y Métodos), las partículas virales fueron purificadas del sobrenadante de cultivo de la cepa 569B infectada. Dichas partículas precipitadas retuvieron la capacidad de infectar nuevos cultivos vírgenes de 569B y mantuvieron su estabilidad en PBS durante al menos 6 meses a 4°C.

Habiendo purificado las partículas virales, el ácido nucleico genómico de VCP1 fue extraído con fenol cloroformo. El análisis del ácido nucleico por digestión con distintas enzimas demostró sus características. El ácido nucleico obtenido fue resistente a la digestión con ribonucleasa H indicando que el

genoma es de ADN y no de ARN (no mostrado); este ADN fue también resistente al tratamiento con diferentes enzimas de restricción pero sensible al tratamiento con nucleasa Mung-Bean y nucleasa S1 (resultados no mostrados), indicando que el genoma del fago está constituido por ADN de simple cadena (ADNsc). Los resultados de una electroforesis de ADN genómico en presencia de naranja de acridina demostraron coincidencia con los anteriores. El naranja de acridina intercalado en el ADN de doble cadena fluoresce verde mientras que intercalado en el ADN de simple cadena fluoresce naranja. Como se esperaba el ADN genómico del fago fluoresció naranja indicando su naturaleza de

simple cadena (resultado no mostrado) y el ADN plasmídico observado en las cepas infectadas fluoresció verde denotando estar compuesto por ADN doble cadena. Experimentos de *Southern blot* hibridados con una sonda obtenida a partir del ADN de las partículas virales demostraron la identidad entre este y el ADN del elemento extracromosomal en la cepa donante SG25-1 y la cepa 569B transducida (Fig. 2). Este resultado confirma que el ADNsc del genoma viral es producido por la FR citoplasmática y sugiere a la vez que estamos en presencia de un fago filamentoso que utiliza un mecanismo de círculo rodante para producir ADNsc a partir de su genoma, ensamblarlo y exportarlo en partículas virales.

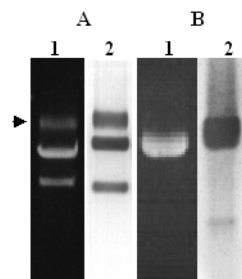


Fig. 2. *Southern blot* para demostrar que la FR citoplasmática es la que genera al ADNsc genómico del fago. Panel A: 1) electroforesis y 2) *Southern* de la FR del fago digerida con *HindIII*. La flecha señala una banda correspondiente a ADNsc citoplasmático que se copurifica con la FR. Panel B: 1) electroforesis y 2) *Southern* del ADNsc genómico del fago.

La observación al microscopio electrónico (ME) de partículas purificadas mostró que efectivamente se trata de un bacteriófago filamentososo (Fig. 3.)

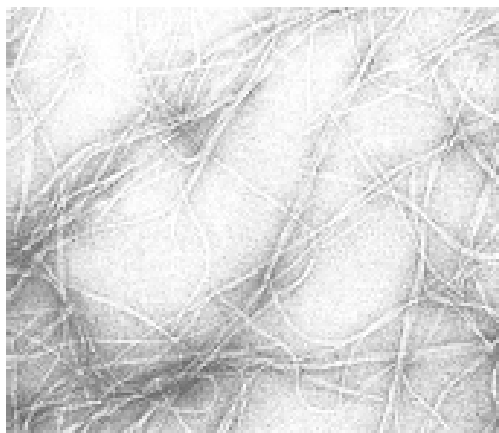


Fig. 3: Partículas del fago aisladas de sobrenadante de cultivo de 569B fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 4% y visualizadas por ME a 50000X.

La forma replicativa del fago aislada de la cepa 569B infectada fue mapeada mediante un análisis de restricción. Dicho mapa (Fig. 4) demostró que el tamaño del genoma

del bacteriófago (7543 b) era diferente y generaba un patrón electroforético diferente al de todos los fagos filamentosos específicos de *Vibrio cholerae* reportados hasta el

momento en la literatura internacional. Estos resultados sugirieron que el fago aislado de SG25-1 no había sido descrito anteriormente y se denominó VCP1.

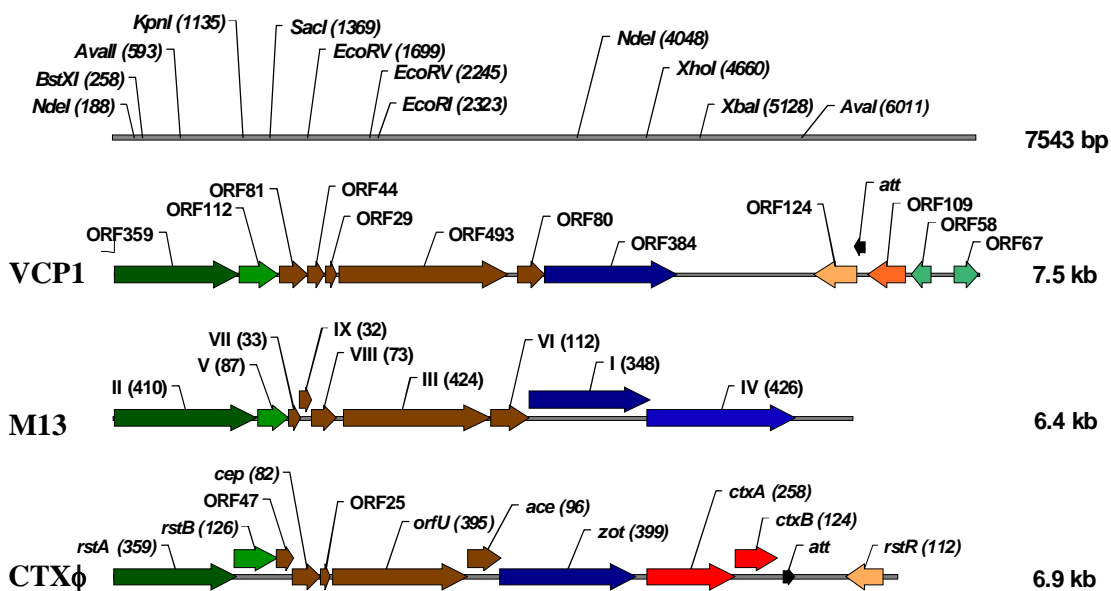


Fig. 4. Mapa de restricción de la FR del fago VCP1 linealizada por el ATG del ORF359 y comparación de la organización genómica con los fagos CTXφ de *V. cholerae* y M13 de *E. coli*. Al lado de cada mapa se muestra el nombre y el tamaño del genoma del fago respectivo. El gen IV de M13 no tiene homólogo en los demás fagos. Los genes *ctxA* y *ctxB* que codifican la toxina colérica, tampoco presentan homólogo en los demás fagos.

El ensayo de titulación por placas opacas (*Materiales y métodos*) mostró que un cultivo de 569B infestado con VCP1 puede producir 3×10^{11} partículas de fago por ml de cultivo, lo cual es inusualmente alto comparado con otros fagos filamentosos descritos en *V. cholerae* como CTX ϕ , que exhibe títulos hasta un máximo de 10^6 partículas por ml.

Secuencia nucleotídica del genoma de VCP1. La secuencia nucleotídica obtenida de VCP1 permitió determinar el tamaño exacto de su genoma, 7543 bases con un 43,39% de G+C. El % de G + C es ligeramente inferior al del genoma de *V. cholerae* (~ 47%). El análisis de la secuencia permitió además identificar los marcos abiertos de lectura (ORF -del inglés open reading frame), y la predicción teórica de sus productos proteicos y luego compararlos con las bases de datos de proteínas disponibles en Internet. Esto permitió confeccionar un mapa del genoma con los ORFs que con mayor probabilidad originan productos proteicos (Fig. 4). Solo aquellos ORFs conservados en cuanto a posición relativa en el genoma, tamaño y (o) homología de su producto proteico con genes descritos en fagos filamentosos conocidos o aquellos ORFs residentes en la región distintiva del fago fueron considerados ORFs más probables.

La organización genómica de

VCP1 fue similar a la de fagos filamentosos bien conocidos como los del grupo Ff (M13, fd y f1) de *E. coli* y a la de otros fagos filamentosos de *V. cholerae* (CTX ϕ , fs1, fs2 y VSK) y *Vibrio parahaemolyticus* (Vf12, Vf33 y Vf03k6) (Fig. 4). Una diferencia importante de VCP1 con los fagos del grupo Ff es que no presenta un gen homólogo al gen IV de estos fagos (Fig. 4). Este gen codifica una porina esencial para el ensamblado de las partículas de los fagos del grupo Ff. El hecho de no estar presente un gen homólogo al gen IV en VCP1, sugiere que este fago utilice una porina del hospedero para el ensamblado de las partículas virales en la membrana tal como ocurre en el caso del fago CTX ϕ .²⁵

Es importante señalar que el análisis de la secuencia de VCP1 mostró la existencia de una estrecha interrelación evolutiva entre este fago y los fagos fs1 y VSK con los cuales comparte varios ORFs altamente homólogos (no mostrado). El ADN de VCP1 comparte también más de un 70 % de homología nucleotídica a través de gran parte de su genoma con los fagos fs1 y VSK. Sin embargo, existen zonas del genoma altamente divergentes y ORFs no compartidos entre estos fagos, además de presentar un tamaño genómico diferente.

Perfil proteico de VCP1. En el análisis mediante electroforesis en geles de poliacríamida con SDS

(*Materiales y métodos*) de las proteínas totales de la cepa 569B infectada con VCP1 se observó una alta expresión de una proteína de talla molecular aparente de 14.2 kDa. Esta proteína no se observó en el control de 569B sin infectar (Fig. 5). La identificación por espectrometría de masas de dicha proteína reveló que se trataba del péptido codificado por el ORF112 (Fig. 4) del fago VCP1. Este análisis también mostró que el péptido maduro posee una masa molecular real de 12.72 kDa y que carece de la metionina inicial. Probablemente esta proteína sea procesada por la metionina aminopeptidasa, como muchas proteínas bacterianas lo son. La metionina aminopeptidasa (peptidasa M) escinde la metionina inicial de los péptidos que presentan un amino ácido pequeño (Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Cys y Val) adyacente a la misma.²⁶ El péptido codificado por el ORF112 presenta una alanina adyacente a la metionina inicial indicando que este procesamiento es posible. La proteína codificada por el ORF112 presenta homología con la proteína V del fago M13 de *E. coli*, una proteína de unión al ADN de simple cadena, útil durante el proceso de replicación del fago por el mecanismo del círculo rodante. Esto sugiere que en el fago VCP1 la proteína identificada realiza la misma función.

El análisis del perfil proteico en SDS-PAGE de partículas de VCP1 purificadas (Fig. 5) demostró que la proteína mayoritaria de la cápsida migra con una masa molecular aparente de aproximadamente 3 kDa. Experimentos similares, utilizando electroforesis en solución tampón Tris-tricina para estimación de masas moleculares de proteínas pequeñas, mostró que la misma proteína migraba con una masa molecular aparente de aproximadamente 6 kDa (resultado no mostrado). Además de la proteína mayoritaria de la cápsida se observaron otras bandas de mucho menor intensidad, algunas de las cuales deben corresponder a proteínas minoritarias de la cápsida (Fig. 5). Tanto la proteína mayoritaria como las bandas minoritarias están siendo estudiadas

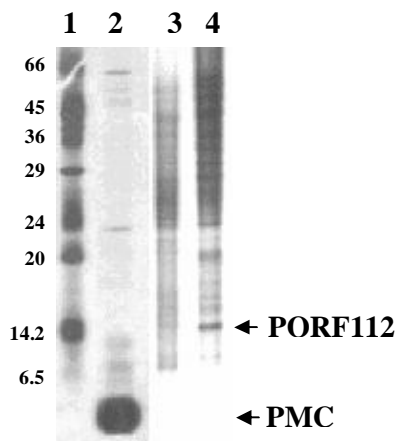


Figura 5. Perfil proteico de VCP1 analizados por SDS-PAGE y tinción con plata. 1) Marcador de peso molecular, los números de la izquierda indican el peso en kDa; 2) Proteínas totales de partículas virales purificadas, obsérvese la proteína mayoritaria de la cápsida (PMC); 3) Proteínas totales de células completas de 569B y 4) Proteínas totales de células completas de 569B infectada con VCP1. Nótese el producto del ORF112 (PORF112).

actualmente por espectrometría de masas para asociarlas con sus genes respectivos y estudiar el procesamiento post-traducciona, si lo hay, en cada una de ellas.

CONCLUSIONES

El fago VCP1 es un nuevo fago filamentoso de *Vibrio cholerae*, capaz de infectar los dos serotipos causantes de cólera, el O1 y el O139. Su genoma está compuesto por ácido desoxirribonucleico de simple cadena de topología circular, con un tamaño de 7543 bases. Es un fago que exhibe altos títulos de transfección comparado con otros bacteriófagos de *Vibrio cholerae*, por lo que resulta de interés estudiar prospectivamente su papel en la patogénesis molecular del cólera y en la transferencia horizontal de genes.

BIBLIOGRAFÍA

- Chopin, M. C., Rouault, A., Ehrlich, S. D. y Gautier, M. Filamentous phage active on the Gram-positive bacterium *Proionibacterium freudenreichii*. **J Bacteriol**, **184**, 2030, 2002.
- Marvin, D. A. y Hohn, B. Filamentous bacterial viruses. **Bacteriol Rev**, **33**, 172, 1969.
- Model, P. y Russel M. Filamentous bacteriophage. In Calendar, R. (ed), Plenum Publishing Corporation, New York. 2, 375, 1988.
- Click, E. M., y Webster, R. E. The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage f1 during infection. **J Bacteriol**, **180**, 1723, 1998.
- Click, E. M., y Webster, R. E.. Filamentous phage infection: Required Interactions with the TolA Protein. **J Bacteriol**, **179**, 6464, 1997.
- Hill, D. F., Short, N. J., Perharm, N. R., y Petersen, G. B. DNA sequence of the filamentous bacteriophage Pf1. **J Mol Biol**, **218**, 349, 1991.
- Marvin, D.A. Filamentous phage structure, infection and assembly. **Curr Opin Struct Biol**, **8**, 150, 1998.
- Eisen, J. A. Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. **Curr Opin Gen & Develop**, **10**, 606, 2000.
- Di Rita, V.J., Peterson, K.M., y Mekalanos, J.J. Regulation of cholera toxin synthesis. The bacteria, Academic. Press, Inc; 11, 355, 1990.
- Kaper, J.B., Fasano, A. and Trucksis, M. Toxin of *Vibrio cholerae*; *Vibrio cholerae* and Cholera: molecular to global perspectives. Eds. Wachsmuth I.K., Blake P.A. y O. Olsvick, Asm Press, Washintong, DC, 145, 1994.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic convection by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. **Science**, 272, 1910, 1996.
- Baudry B., Fasano A., Ketley J. and Kaper J. B. Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produce by *Vibrio cholerae*. **Infect Immun**, **60**, 428, 1992.
- Trucksis M., Galen J.E., Michalski J., Fasano A. and Kaper, J.B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *V. cholerae* virulence cassette. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**, 5267, 1993.
- Jouravleva, E.A., et al. Characterization and possible function of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, **315**, 1998
- Sudeshna K., Ranajit K., Ghosh Amar N., Ghosh, A. Integration of the DNA of A novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* O139 into the host chromosomal DNA. **FEMS Microbiology Letters**, **145**, 17, 1996.
- Shimodori S., Lida K., Kojima F., Takad A., Ehara M., and Amak K. Morphological Features of filamentous phage of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **Microbiol Immunol**, **41**, 757, 1997.
- Ikema M., and Honma Y. A novel filamentous phage, fs2, of *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **144**, 1901, 1998.
- Yanish-Perron C., Vieira J. and Messing J. **Gene**, **33**, 103, 1995.
- Sanger F. and Coulson A.R.A. Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polimerasa. **J Mol Biol**, **94**, 441, 1975.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Chomczynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Analyt Biochem**, **201**, 134, 1992.
- Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, **16**, 6127, 1988.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680, 1970
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl K. Short protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, New York, 1995.
- Davis B.M., Lawson E.H., Sandkvist M., Ali A., Sozhamannan, S., Waldor, M.K. **Science**, **288**(5464), 333, 2000.
- Adams J.M. On the release of the formyl group from nascent protein. **J Mol Biol**, **33**, 571, 1968.

The genome of *Vibrio cholerae* contains two different and functional genes for aspartate semialdehyde dehydrogenases

Karen Marrero, Emilio Marrero, Yussuan Silva, Boris Rodríguez, Javier Campos, Talena Ledón, Edgar Valle and Rafael Fando.*

Dpto. de Genética, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 27 de noviembre de 2002. Aceptado: 13 de diciembre de 2002.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, deshidrogenasa del aspartato-semialdehído, mutantes *asd*, VC2036, VC2107.

Key words: *Vibrio cholerae*, aspartate semialdehyde dehydrogenase, *asd* mutants, VC2036, VC2107.

RESUMEN. En *Vibrio cholerae* se identificaron dos genes *asd*, los cuales fueron clonados en *Escherichia coli* χ 6097, por complementación del defecto de la deshidrogenasa del aspartato semialdehído (Asd). La actividad de la Asd fue también confirmada *in vitro* para cada producto génico. Se determinaron las secuencias nucleotídicas y los polipéptidos predichos, los cuales fueron comparados con las secuencias depositadas en las bases de datos *Genbank* y *Swissprot*, respectivamente. Cada producto génico pertenece a uno de los dos grupos de homología encontrados para Asd en la base de datos *Swissprot*. Los genes *asd* descritos en este trabajo corresponden a los genes VC2036 y VC2107 del cromosoma I del genoma de *V. cholerae* depositado en el Instituto de Investigaciones Genómicas (TIGR) de EE.UU. Se obtuvieron mutantes de cada gen, pero el doble mutante solo se obtuvo en presencia de un gen *asd* complementario en *trans*. Estos mutantes fueron caracterizados microbiológicamente, así como su comportamiento *in vivo* e *in vitro*, en modelos animales y bajo condiciones de laboratorio.

ABSTRACT. Two *asd* genes were identified in *Vibrio cholerae* and cloned in *E. coli* on the basis of their ability to complement the Asd defect of strain χ 6097. The aspartate semialdehyde dehydrogenase activity of each gene product was also confirmed *in vitro*. Although both genes were able to complement the *asd* defect in *E. coli*, they were of different size and no important homology was found between them. The nucleotide sequences and the predicted polypeptides were established and compared with the sequences deposited in the Genbank and the Swissprot, respectively. Each gene product belongs to one of two groups of homology found for Asd in the Swissprot. The *asd* genes found in this work corresponded to genes VC2036 and VC2107 of the chromosome I of the *Vibrio cholerae* genome deposited at the TIGR. Mutants in each of these genes were obtained and characterized microbiologically, but the double mutant was only attained in the presence of a *trans*-complementing *asd* gene. This restriction to generate the double mutant was found to reflect the absence of an efficient mechanism for diaminopimelic acid (DAP) transport in *Vibrio cholerae*. The *in vivo* and *in vitro* behavior of the constructed mutants was also evaluated in animal models and under conditions of laboratory.

INTRODUCTION

Bacteria synthesize lysine, methionine, threonine and isoleucine from aspartate.¹ Two successive enzymatic reactions convert aspartate into aspartate semialdehyde, the precursor used for the synthesis of DAP and lysine in the lysine branch of the pathway and for the synthesis of homoserine, the common precursor of methionine, threonine and isoleucine in the two other specific branches of the pathway.

Aspartate semialdehyde dehydrogenase, encoded in the *asd* gene, is the enzyme that converts β -aspartyl phosphate into aspartate semialdehyde. The *asd* genes from several bacteria have been studied, cloned and sequenced.¹⁻¹¹ According to their nucleotide sequences and predicted polypeptides, they can be classified into two groups of homology. The factors that determine which of these groups is represented in each bacteria, are not established. However, a single gene belonging to one of these families has been described in several bacterial species to date. It is yet unexplained why there is only a single aspartate semialdehyde dehydrogenase in bacteria where

* Corresponding author.
Email: rafael.fando@cnic.edu.cu