

# Estudio de los genes VCA0260 y VCA0261 de *Vibrio cholerae* y de la proteína única que codifican

Karen Marrero, Noel Duany, Aniel Sánchez\*, Luis Javier González\*, Edith Suzarte, Talena Ledón, Javier Campos, Boris Luis Rodríguez, Arielis Rodríguez Ulloa<sup>+</sup>, Lila Castellanos Serra\* y Rafael Fando.

Departamento de Genética, Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6414, Cuba. Teléfono: 208 5236 ext. 248, Correo electrónico: [karen.marrero@cnic.edu.cu](mailto:karen.marrero@cnic.edu.cu)

Recibido: 10 de enero de 2006. Aceptado: 1 de febrero de 2007.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, VCA0260, VCA0261, homeostasis del cobre.  
Key words: *Vibrio cholerae*, VCA0260, VCA0261, copper homeostasis.

**RESUMEN.** La secuencia del genoma de *Vibrio cholerae* N16961 está depositada en una base de datos del Instituto de Investigaciones del Genoma de E.U.A. (TIGR, por sus siglas en inglés). En esa base de datos los genes VCA0260 y VCA0261 están anotados como dos genes superpuestos e independientes que codifican para dos proteínas hipotéticas de 11,9 kDa y 7,3 kDa, respectivamente. Previamente, en el laboratorio de los autores, se realizó un estudio proteómico de la cepa de *V. cholerae* C7258 cultivada en anaerobiosis. En ese trabajo se identificó una mancha de proteína sobre-expresada en esas condiciones que contenía péptidos pertenecientes a las proteínas codificadas por los genes VCA0260 y VCA0261. Este hallazgo sugirió que los genes VCA0260 y VCA0261 constituían un único gen que codificaba una sola proteína. En el presente trabajo se describe la amplificación por PCR, clonación y secuenciación de las regiones de los ADN cromosómicos que comprenden a los genes VCA0260 y VCA0261 de las cepas de *V. cholerae* N16961 y C7258. Se encontró que las secuencias nucleotídicas de las regiones provenientes de ambas cepas son idénticas entre sí, y diferentes a la publicada en el TIGR. La secuenciación reveló la presencia de un nucleótido de guanina precediendo el codón de parada del gen VCA0261, no incluido en la secuencia publicada en el TIGR. Esta guanina provoca un corrimiento del marco de lectura del ORF (*Open Reading Frame*) VCA0261 al mismo del ORF VCA0260, generándose un ORF más largo que contiene a los anteriores. Este nuevo ORF codifica para una proteína de 18,7 kDa de peso molecular. La síntesis de esta proteína en *Escherichia coli*, a partir de las regiones clonadas, se corroboró por espectrometría de masas. Así, los genes VCA0261 y VCA0260 constituyen un único gen (VCA0261-VCA0260) que codifica una proteína en *V. cholerae*. Por otro lado, la región del ADN cromosómico que contiene a este gen se alecionó de la cepa de *V. cholerae* C7258, y el mutante así obtenido se evaluó en cuanto a sensibilidad a  $\text{CuSO}_4$  en medio sólido. Se encontró que el mutante era más sensible al cobre que la cepa parental, lo que sugirió que la proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260 está relacionada con la homeostasis a este ión en dicho microorganismo. Esta proteína, sin embargo, no parece ser importante para la colonización de *V. cholerae* en presencia de  $10 \mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

**ABSTRACT.** The sequence of the genome of *Vibrio cholerae* N16961 is deposited in a database of The Institute for Genomic Research (TIGR). In that database, genes VCA0260 and VCA0261 are annotated as two independent and overlapped genes, which are predicted to encode two hypothetical proteins of 11.9 kDa and 7.3 kDa of molecular weight, respectively. In a previous proteomic study of *V. cholerae* C7258 cells, one spot up-regulated under anaerobic culture revealed a correspondence with predicted polypeptides from genes VCA0260 and VCA0261. This finding suggested that genes VCA0260 and VCA0261 constitute a single gene encoding a single protein. Here, it is described PCR amplifications, cloning and nucleotide sequencing of regions spanning both genes from *V. cholerae* strains C7258 and N16961. Nucleotide sequencing of both regions showed the existence of a guanine nucleotide preceding the stop codon of VCA0261, which is absent in the published sequence. The presence of this guanine changes the reading frame of

ORF VCA0261 to the same as VCA0260, resulting in a predicted larger ORF coding for a protein of 18.7 kDa of molecular weight. Production of this protein was corroborated by expression, purification and sequencing by mass spectrometry of the peptide synthesized from cloned regions in *Escherichia coli*. Thus, VCA0260 and VCA0261 genes constitute a single gene (VCA0261-VCA0260) encoding a single protein. A mutant of *V. cholerae* C7258 with the gene VCA0261-VCA0260 deleted from its chromosome was constructed. In the presence of copper, growth of the VCA0261-VCA0260 mutant was affected compared to the growth of wild type strain, suggesting that the protein coded by VCA0261-VCA0260 gene is involved in copper homeostasis in *V. cholerae*. On the other hand, this protein does not seem to play an important role during the colonization process in the presence of  $10 \mu\text{mol/L}$  of copper, in an infant mouse model of cholera colonization.

## INTRODUCCION

El cólera es una enfermedad diarreica severa caracterizada por el comienzo abrupto de diarreas profusas, acompañadas de vómitos y fiebre, estado que conduce a la deshidratación y a la acidosis metabólica. Si no es tratado, el cólera provoca la muerte en el 50 al 70 % de los casos afectados.<sup>1</sup> Esta enfermedad es típica de países subdesarrollados con sistemas de salud deficientes y pobres condiciones sanitarias, donde encuentra un ambiente propicio para su expansión y constitución en epidemias.<sup>1</sup>

El agente causal del cólera es la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae*.<sup>1</sup> La secuencia del genoma de la cepa de *V. cholerae* El Tor N16961 fue publicada en el año 2000,<sup>2</sup> y está depositada en una base de datos en el Instituto de Investigaciones del Genoma en E.U.A. (TIGR, por sus siglas en inglés). El genoma de esta bacteria consiste en dos cromosomas circulares de aproximadamente 2,96 y 1,07 Mb que contienen un total de 3 885 marcos abiertos de lectura (ORF) predichos.<sup>2</sup> Aunque la secuenciación del genoma es un importante primer paso en cuanto al conocimiento de este microorganismo, un 42 y un 52 % de los genes predichos para el cromosoma 1 y 2, respectivamente, codifican para proteínas hipotéticas y de función desconocida.<sup>2</sup> Por lo tanto, se impone realizar estudios que permitan identificar la función de estas proteínas y sus posibles papeles durante la patogénesis y supervivencia ambiental de *V. cholerae*.

Los genes VCA0260 y VCA0261 del cromosoma 2 de *V. cholerae* están solapados 4 pb y codifican para dos proteínas hipotéticas independientes de 11,9 y 7,3 kDa, respectivamente, según anotación en el TIGR. En un análisis proteómico por electroforesis bidimensional de la cepa de *V. cholerae* C7258, realizado en el laboratorio de los autores, se detectó la sobre-expresión anaeróbica de una mancha de proteína que al ser identificada resultó contener péptidos cuyas secuencias correspondieron a las proteínas hipotéticas codificadas por los genes VCA0260 y VCA0261.<sup>3</sup> Este hallazgo, junto al hecho de que la mancha identificada mostró un tamaño de ~ 21 kDa, mayor que el esperado para las dos proteínas hipotéticas, sugirió que los genes VCA0261 y VCA0260 constituyen un único gen que codifica para una sola proteína de ~ 20 kDa. En el análisis proteómico se encontró además, que muchas de las proteínas sobre-expresadas en anaerobiosis estaban relacionadas con la virulencia y el 75 % de los genes codificadores de las proteínas identificadas como sobre-expresadas en esta condición fueron inducidos *in vivo* en un modelo animal en *V. cholerae*.<sup>3</sup> Aun cuando los genes VCA0260 y VCA0261 no fueron detectados como inducidos *in vivo*,<sup>4</sup> se ha sugerido que los genes del cromosoma 2 de *V. cholerae* pueden desempeñar un papel importante durante la multiplicación en el intestino humano.<sup>4</sup> Por todas estas razones, en este trabajo se

decidió determinar si efectivamente los genes VCA0260 y VCA0261 constituían un único gen en *V. cholerae*, así como la función celular de la proteína codificada por este en diferentes condiciones de cultivo e *in vivo*.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo utilizados

La cepa *Escherichia coli* JM109 [*recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*)] se utilizó como hospedero durante las clonaciones en el vector pIJ2921.<sup>5</sup> La cepa *E. coli* SM10 $\lambda$ pir (*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu* ( $\lambda$ pirR6K), *Km*<sup>r</sup>) se usó como hospedero para la clonación en el vector suicida pCVD442,<sup>6</sup> así como cepa donadora en los experimentos de conjugación con *V. cholerae*. Las cepas de *V. cholerae* C7258 (O1, El Tor, Ogawa, Peru, 1991) y N16961 (O1, El Tor, Inaba, Bangladesh, 1975) se emplearon para la obtención del ADN cromosómico usado como molde durante la amplificación de la región que contiene los genes VCA0260 y VCA0261. La cepa de *V. cholerae* C7258 se utilizó además, en la construcción de un mutante carente de los genes VCA0260 y VCA0261 de su genoma. La cepa de *V. cholerae* 2<sub>3-12</sub><sub>31</sub> (C7258  $\Delta$ *copA*) se empleó como control negativo en los experimentos de complementación.

Se utilizaron los medios de cultivo LB (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0,5 % y cloruro de sodio, 1 %), LB-sacarosa (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0,5 % y sacarosa, 10 %) y Syncase (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 %; NH<sub>4</sub>Cl, 0,118 %; glucosa, 0,4 % e hidrolizado de caseína, 1 %). Este medio se suplementó con sales minerales que contenían Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 626  $\mu$ mol/L; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 206  $\mu$ mol/L; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ mol/L y FeCl<sub>3</sub>, 18  $\mu$ mol/L. Para preparar medio sólido se añadió agar al 1,5 %. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0,1 mmol/L; 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-Gal) a 40  $\mu$ g/mL y los antibióticos ampicilina (A) a 100  $\mu$ g/mL y polimixina B (P) a 100 U/mL. Los componentes de los medios de cultivos fueron suministrados por Oxoid.

Para crear las condiciones de cultivo anaerobias, se utilizó el sistema de sacos Anaerogen, Oxoid, en jarra anaeróbica cerrada, según las recomendaciones del fabricante.

### Transformación bacteriana

Las cepas de *E. coli* y *V. cholerae* se transformaron mediante electroporación, según Dower y col.<sup>7</sup> y Stoebner y Payne,<sup>8</sup> respectivamente. Para transformar plásmidos suicidas en *V. cholerae* se utilizó el método de conjugación bacteriana. Para ello, se sembraron mezcladas en una misma placa de LB sólido la cepa donadora *E. coli* SM10 $\lambda$ pir transformada con el plásmido suicida y la receptora *V. cholerae* C7258. Al cabo de 4 h de incubación a 37 °C la superficie de la placa se lavó con 1 mL de LB para recoger las bacterias. Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, de las cuales se sembraron 100  $\mu$ L en placas de LBAP. En presencia de estos antibióticos sólo crecen los transformantes de *V. cholerae* que adquirieron e integraron a su genoma el plásmido suicida de *E. coli*. La presencia de polimixina en el medio contraselecciona las células de *E. coli* que son sensibles a este antibiótico y la ampicilina contraselecciona las células de *V. cholerae* que no recibieron el plásmido.

### Técnicas usadas en el trabajo con el ADN

El aislamiento de ADN genómico se realizó según el método de Ausubel y col.<sup>9</sup> y la purificación de ADN plasmídico mediante los sistemas *Wizard Plus Midipreps DNA purification system* y *Wizard Plus Minipreps DNA purification system*, ambos de Promega. La separación del ADN en geles de agarosa se hizo según Sambrook y col.<sup>10</sup> y la purificación de fragmentos de ADN a partir de estos se realizó utilizando el sistema *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de Amersham Pharmacia Biotech según las recomendaciones del fabricante.

Las enzimas de modificación-restricción, polimerasas, nucleasas y ligasas se utilizaron según los protocolos convencionales.<sup>9</sup>

La secuenciación del ADN se realizó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) utilizando un secuenciador *ALFexpress* y el sistema *Thermo Sequenase CyS dye terminator kit*, ambos de Amersham Pharmacia Biotech. Los cebadores utilizados en cada reacción de secuencia fueron los cebadores directo y reverso de la serie M13/pUC, que son complementarios a las regiones adyacentes al sitio múltiple de clonación del pIJ2921. El resultado obtenido en la secuenciación se comparó con la secuencia nucleotídica del genoma completo

de *V. cholerae* N16961 depositada en el TIGR. El análisis de secuencias se realizó con los programas *Redasoft Visual Cloning 2000* y *NTI Vector 6.0*.

La técnica de hibridación de *Southern blot* se realizó según Sambrook y col.<sup>10</sup> Las muestras de ADN, digeridas previamente con las enzimas de interés, se separaron en un gel de agarosa 1 % y se transfirieron a una membrana de nylon del tipo Hybond-N según un procedimiento de transferencia alcalina por capilaridad descendente.<sup>11</sup> La detección se realizó con el sistema de marcado y detección no radioactivo para digoxigenina (Roche), según las instrucciones del fabricante.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo en el equipo de ciclos térmicos PTC150 (MJ Research, EUA) y cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL que contenía 200 ng de ADN molde; 5 µL de disolución reguladora de reacción 10X (Promega); 5 µL de una suspensión de los cuatro desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (2 mmol/L); 1 µL del oligonucleótido directo (50 µmol/L), 1 µL del oligonucleótido reverso (50 µmol/L); 1 U de la polimerasa de gran fidelidad *pfu* (Promega) y 36 µL de H<sub>2</sub>O destilada estéril. En un primer caso, se amplificó el fragmento que contenía a los genes VCA0260 y VCA0261 a partir del ADN cromosomal de las cepas de *V. cholerae* C7258 y N16961. Para esta reacción se usó el par de cebadores 5'-GCT CTA GAT GTG TAT TTT CAC GCC-3' y 5'-AGT GTC AAC AAA TAG GAA AGA GG-3' los cuales son complementarios a las regiones cuesta arriba y abajo de la región a amplificar, respectivamente. En la secuencia de los cebadores cuesta arriba y cuesta abajo se incluyeron sitios de corte para las enzimas *XbaI* y *HincII*, respectivamente, para facilitar la posterior clonación de los fragmentos amplificados.

Adicionalmente, la técnica de PCR se utilizó para obtener un fragmento con las regiones adyacentes a los genes VCA0260 y VCA0261 fusionadas, el que más tarde se utilizó para construir el mutante molecularmente definido con estos genes deletionados. Para esto, primeramente se amplificaron los fragmentos flanqueantes a los genes VCA0261-VCA0260 de manera independiente, a partir del ADN cromosómico de la cepa de *V. cholerae* C7258. Los cebadores 8865 (5'-CTT CAG CTT TTA TCA TGG TTA GGT TCC T-3')

y 8866 (5'-GGA TTT ACT GCG ATT AAT GAA GAG AGG-3') se usaron para amplificar el segmento de 796 pb cuesta arriba de VCA0260 y el par 8867 (5'-GAT AAA AGC TGA AGC GGG AAT GGT GAA A-3') y 8868 (5'-TGC TGC TCA AGT GCT GCG CGA TAA ACC T-3') se usó para amplificar el segmento de 985 pb cuesta abajo de VCA0261. Los cebadores 8865 y 8867 comparten entre sí una secuencia complementaria de 14 pb, lo que posibilita la posterior fusión de los fragmentos amplificados. En una segunda etapa, los productos del PCR obtenidos en las reacciones independientes se purificaron y mezclaron y utilizaron como ADN molde en una segunda reacción de amplificación. En esta reacción solo se usaron los cebadores 8866 y 8868 y el programa de amplificación constó de dos secuencias: en los primeros cinco ciclos se usó como temperatura de apareamiento 40 °C y en los últimos 25 ciclos, se utilizó 65 °C. El tiempo de extensión en ambas secuencias fue de 2 min.

#### Clonación del fragmento de ADN cromosómico que contiene los genes VCA0260 y VCA0261

Los fragmentos resultantes de la amplificación por PCR de la región que contenía los genes VCA0260 y VCA0261, utilizando como moldes los ADN genómicos de las cepas de *V. cholerae* C7258 y N16961, se digirieron con las enzimas de restricción *XbaI* y *HincII* y se clonaron en el plasmidio pIJ2921 digerido con las mismas enzimas. Dos clones con el inserto derivado del producto de PCR obtenido a partir de los ADN genómicos de las cepas C7258 y N16961 se denominaron pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2, respectivamente.

#### Condiciones de inducción de la expresión de los genes clonados

Para los estudios de expresión proteica las suspensiones de los clones pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2 se extendieron en LBA y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Dos colonias frescas de cada suspensión se inocularon independientemente en 5 mL de LBA y se incubaron a 37 °C y 220 r/min hasta que alcanzaron una densidad óptica de aproximadamente 0,4 a 0,5 a 600 nm. En ese momento, se les adicionó el inductor IPTG y se dejaron crecer en las mismas condiciones durante 3 h. Alícuotas de  $4 \cdot 10^8$  células se conservaron para su análisis por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

#### Electroforesis de proteínas

Las electroforesis de proteínas se realizaron según protocolos normalizados,<sup>9</sup> utilizando geles de acrilamida 12,5 %. Los geles se revelaron con azul Coomassie según Ausubel y cols.<sup>9</sup>

#### Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Para la identificación de proteínas por espectrometría de masas se contrataron los servicios que brinda la División de Química Física del CIGB y el análisis se realizó a partir de la banda de proteína proveniente de una SDS-PAGE teñida con Coomassie.

#### Análisis de las secuencias aminoacídicas

El programa BLASTP se utilizó para buscar homología con las secuencias peptídicas depositadas en las bases de datos internacionales. El programa ClustalW se utilizó para realizar los alineamientos de secuencias.

#### Clonación de un fragmento que contenía las regiones flanqueantes a los genes VCA0260-VCA0261

El fragmento obtenido por PCR que contenía la fusión de las regiones flanqueantes a los genes VCA0260-VCA0261, donde la zona codificadora de estos fue suprimida del interior de la secuencia, se digirió con las enzimas *SspI* y *HpaI* y se clonó en el vector pIJ2921 digerido con *HincII*. Un clon recombinante portador del fragmento de interés se denominó pIJ ΔVCA0261-0260 y se conservó a -70 °C en LB con glicerol al 20 %.

#### Construcción del plasmidio suicida pCV-ΔVCA0261-0260

El fragmento *BglIII-XbaI* de 1,66 kb proveniente del pIJ ΔVCA0261-0260 se clonó en el pCVD442 digerido con las mismas enzimas, con lo que se obtuvo el pCV-ΔVCA0261-0260.

#### Construcción de derivados de la cepa de *V. cholerae* C7258 con los genes VCA0260-0261 suprimidos

La construcción de un mutante que no portara los genes VCA0260-VCA0261 en su cromosoma se realizó mediante reemplazamiento alélico de la región que contenía a estos genes en el cromosoma de la cepa de *V. cholerae* C7258 con esa misma región mutada presente en el plasmidio suicida pCV-ΔVCA0261-0260. Este plasmidio se introdujo en *V. cholerae* mediante conjugación y los cointegrantes se selecciona-

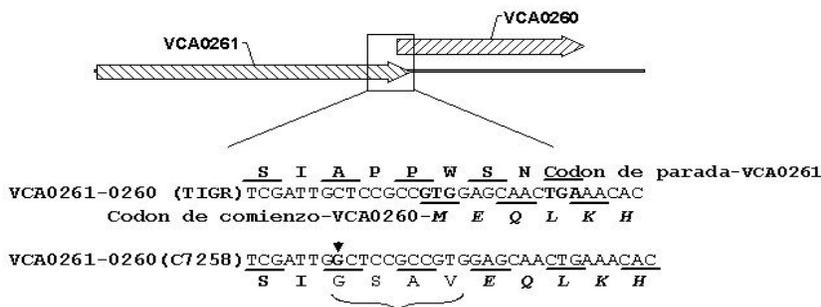
ron en placas de LBAP. El sitio de integración de los plasmidios en el cromosoma de cinco cointegrantes se analizó mediante *Southern blot*. Se escogieron tres clones en los que la integración ocurrió por recombinación homóloga entre la región mutada presente en el plasmidio y la del cromosoma. Dichos clones se cultivaron en caldos de LB sin presión selectiva de antibióticos, condición permisible para la proliferación de la fracción de la población microbiana que eliminó las secuencias de vector de su genoma. Alícuotas de estos cultivos se sembraron en placas de LB-sacarosa y se dejaron crecer a 37 °C. Se tomaron diez colonias de cada placa y se replicaron en nuevas placas de LB y LBA. Se seleccionaron tres segregantes de cada cointegrante para verificar sus estructuras genómicas a través de hibridación por *Southern blot*. Los clones correctos se conservaron a -70 °C en LB con glicerol 20 % y se seleccionó, para posterior caracterización en cuanto a la sensibilidad al cobre y colonización en modelo de ratón lactante, al clon denominado *V. cholerae* C7258-ΔVCA0261-0260-2<sub>3</sub>.

#### Análisis de complementación del mutante

La cepa mutante de *V. cholerae* C7258-ΔVCA0261-0260-2<sub>3</sub> se transformó con el plasmidio pIJ-N830-1, que contenía los genes VCA0260-VCA0261 salvajes y con el pIJ2921 como control. Los transformantes se seleccionaron en LBA y posteriormente, se les determinó su nivel de sensibilidad al cobre en medio sólido.

#### Sensibilidad al cobre

La sensibilidad al cobre de la cepa parental *V. cholerae* C7258 y el mutante C7258-ΔVCA0261-0260-2<sub>3</sub> se determinó a las 24 h de crecimiento en medio Syncase sólido que contenía diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. Este ensayo se realizó en condiciones de cultivo aerobias y anaerobias. Las suspensiones de las cepas a caracterizar se extendieron en LB y se incubaron toda la noche a 37 °C. Una colonia fresca de cada suspensión se inoculó en 5 mL de Syncase y se incubó a 220 rev/min y 37 °C hasta que alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 1 a 600 nm. Partiendo de una dilución 10<sup>-6</sup> de estos cultivos se extendieron 20 μL en un cuadrante de placas que contenía las diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. En condiciones aerobias se evaluó el crecimiento de las cepas en 0,5;



**Fig. 1.** Representación esquemática de la organización genética de los genes VCA0261 y VCA0260 en el cromosoma 2 de *V. cholerae* N16961 según TIGR. Se presentan las secuencias nucleotídicas de la región donde los dos genes se solapan, de acuerdo con la secuencia publicada en el TIGR (TIGR) y la determinada para la cepa C7258 en este estudio (C7258), así como sus respectivas secuencias aminoácidas predichas. En oscuro y con cabeza de saeta, se resalta el nucleótido de guanina identificado en la secuencia de C7258. Dentro de una llave, los aminoácidos nuevos que se sintetizan a partir del corrimiento del marco de lectura en VCA0261 por inserción de la guanina.

1,0; 1,5; 2,0 y 4,0 mmol/L de CuSO<sub>4</sub>. En el caso de condiciones de cultivo anaerobias se utilizaron concentraciones de 15, 40, 100 y 200 μmol/L.

#### Ensayo de colonización de los mutantes en el modelo de ratón lactante

Ratones BalB/c de 3 a 5 d de nacidos, separados de sus madres 4 h antes, se inocularon intra-gástricamente con aproximadamente 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa bacteriana a evaluar. Las células de *V. cholerae* para el inóculo se crecieron en 5 mL de LB a 37 °C hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm, partiendo de colonias frescas en placas de LB. En el caso donde se evaluó la capacidad de colonización de las cepas en presencia de cobre, al inóculo se añadió 10 μmol/L de CuSO<sub>4</sub>. Luego de inoculados, los ratones se dejaron toda la noche a temperatura ambiente en ausencia de sus madres. Al cabo de las 24 h de inoculación, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el intestino delgado, el cual se lavó dos veces con PBS (NaCl, 137 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9,58 mmol/L, KCl, 2,68 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,47 mmol/L; pH 7,2) y se homogenizó en un volumen de 5 mL de la misma disolución. Los títulos bacterianos en cada inóculo y los homogenizados se determinaron por extensión de las diluciones seriadas de cada uno en placas de LB.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

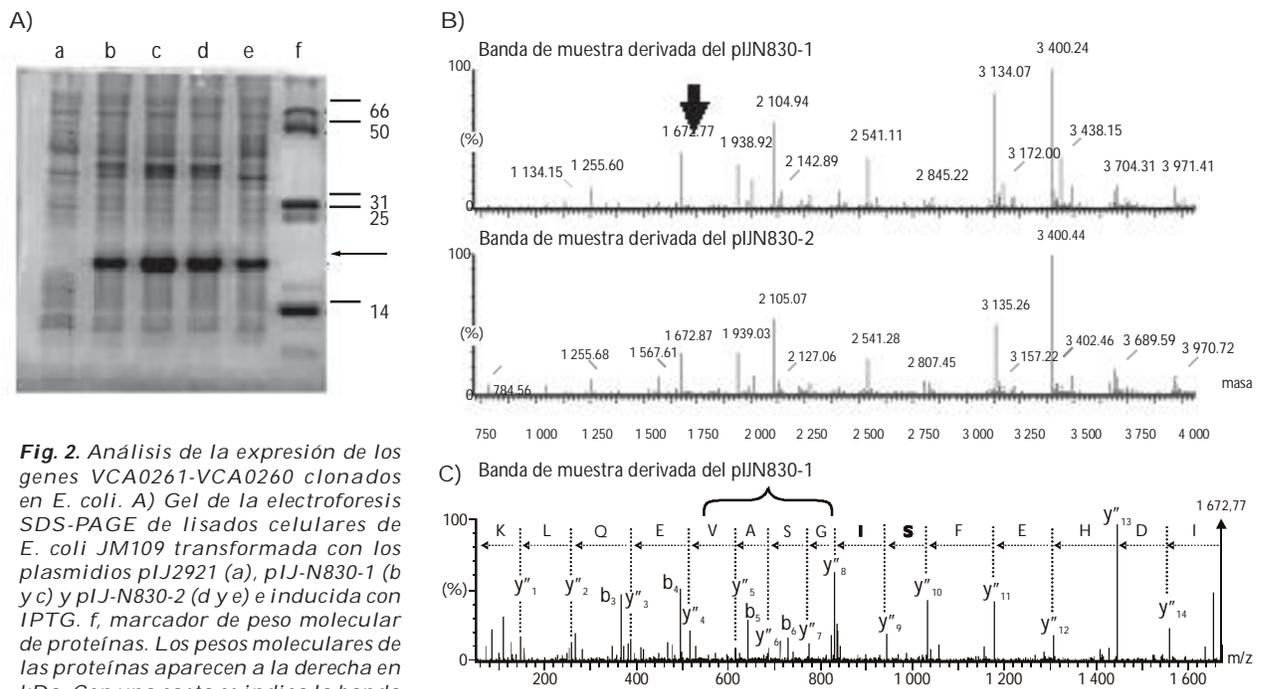
##### Los genes VCA0260 y VCA0261 constituyen un único gen que codifica para una sola proteína

Para determinar si la proteína de ~ 20 kDa, correspondiente a las proteínas codificadas por los genes VCA0260 y VCA0261 según el

estudio proteómico de la cepa de *V. cholerae* C7258,<sup>3</sup> era sintetizada en esta cepa como una sola debido a una diferencia a nivel génico entre ella y la N16961, se amplificó por PCR la región del cromosoma que incluía a los genes VCA0260 y VCA0261. En las reacciones de amplificación se utilizó adicionalmente como molde el ADN cromosómico proveniente de la cepa N16961. Estos fragmentos se clonaron según lo explicado en *Materiales y Métodos*, con lo que se obtuvieron los plasmidios pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2, los que contienen la región codificadora de los genes VCA0261 y VCA0260 de las cepas C7258 y N16961, respectivamente.

Posteriormente, los insertos presentes en los plasmidios pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2 se secuenciaron y se encontró que sus secuencias eran idénticas entre sí y diferentes a la reportada en el TIGR. La secuenciación reveló un nucleótido de guanina precediendo al codón de parada del ORF VCA0261, que no estaba presente en la secuencia publicada (Fig. 1). La inserción de esta guanina origina un cambio en el marco de lectura predicho del ORF VCA0261 al mismo marco de lectura del ORF VCA0260, hecho que generó un ORF más largo, que contiene a los anteriores, y que produce una proteína de 18,7 kDa. Este valor concuerda con el valor observado para la mancha de proteína en el experimento de proteómica (21 kDa).<sup>3</sup> Así, el resultado de la secuenciación sugiere la existencia de un único gen que comprende a los genes VCA0260 y VCA0261.

Para corroborar el resultado obtenido en el experimento de secuenciación nucleotídica, se estudiaron las proteínas sintetizadas en *E. coli* a partir de



**Fig. 2.** Análisis de la expresión de los genes VCA0261-VCA0260 clonados en *E. coli*. A) Gel de la electroforesis SDS-PAGE de lisados celulares de *E. coli* JM109 transformada con los plasmidios pIJ2921 (a), pIJ-N830-1 (b y c) y pIJ-N830-2 (d y e) e inducida con IPTG. f, marcador de peso molecular de proteínas. Los pesos moleculares de las proteínas aparecen a la derecha en kDa. Con una saeta se indica la banda mayoritaria. B) Espectros obtenidos por espectrometría de masas durante la identificación de la banda mayoritaria de las carrileras b y d. Con una saeta se señala el pico correspondiente al péptido tríptico codificado por la región donde los genes VCA0261-VCA0260 se solapan. C) Secuencia aminoacídica del péptido señalado en B. Dentro de una llave, los aminoácidos nuevos que son codificados a partir del corrimiento del marco de lectura predicho en VCA0261 a raíz de la inserción de la guanina.

los fragmentos clonados en los plasmidios pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2. Estas construcciones permiten la inducción de la síntesis de las proteínas codificadas por los genes clonados y su posterior purificación y secuenciación por espectrometría de masas. El patrón de expresión proteica de las células de *E. coli* JM109 inducidas, que contienen los clones pIJ-N830-1 y pIJ-N830-2, poseen una banda de proteína mayoritaria de aproximadamente 20 kDa de peso molecular (Fig. 2A), lo que sustenta la existencia de un único gen que codifique para una sola proteína en los fragmentos clonados. Las bandas mayoritarias de proteína, purificadas de las carrileras del gel SDS-PAGE derivadas de cada clon, se identificaron de modo independiente por espectrometría de masas. Los espectros de ambas proteínas fueron idénticos (Fig. 2B), lo que reveló una similitud a nivel de secuencia aminoacídica entre las proteínas producidas a partir de los genes VCA0260 y VCA0261 provenientes de las cepas C7258 y N16961. Adicionalmente, el péptido tríptico codificado por la región donde los genes VCA0261 y VCA0260 se solapan se identificó (señalado en la Fig. 2B con una saeta) y se secuenció (Fig. 2C). Se encontró una total correspondencia entre su secuencia

aminoacídica y la predicha por la secuencia nucleotídica obtenida para esa región (Fig. 1 y 2C). Estos resultados corroboraron que los genes VCA0260 y VCA0261 constituyen un único gen (VCA0261-VCA0260) que codifica para una sola proteína en *V. cholerae* C7258 y N16961. El porqué la secuencia de la cepa N16961 disponible en el laboratorio es diferente a la publicada en el TIGR no está claro, pero se ha reportado previamente un hallazgo similar.<sup>12</sup> Este resultado evidencia la importancia de realizar estudios de expresión génica aun cuando se haya determinado la secuencia nucleotídica del genoma de un microorganismo.

**La proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260 parece estar relacionada con la resistencia a cobre en *V. cholerae***

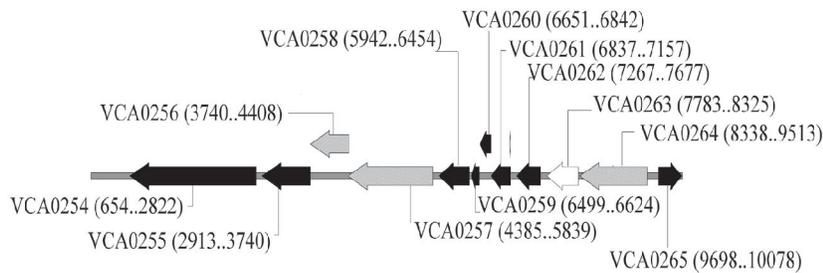
Para explorar la posible función de la proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260, primeramente se analizó la organización génica de la región en el cromosoma donde se encuentra este gen. Estos genes están ubicados dentro de una agrupación de genes codificados en la misma cadena y transcritos en el mismo sentido, en el cromosoma 2 de *V. cholerae*, los cuales codifican para proteínas

hipotéticas (VCA0258, VCA0259 y VCA0262) y reguladores transcripcionales (VCA0256-VCA0257 y VCA0264), según anotación en el TIGR (Fig. 3). Utilizando un paquete de programas informáticos que predice la existencia de operones,<sup>13</sup> teniendo en cuenta la cercanía de los genes, así como la conservación de la organización en al menos otro genoma, se predice que los genes incluidos desde VCA0254 a VCA0264 forman un operón,<sup>14</sup> lo que sugiere una relación funcional entre ellos. Los reguladores transcripcionales predichos en este operón son homólogos a reguladores dependientes de metales, lo que apunta a un posible papel de los genes incluidos en el operón en la resistencia a metales.

La proteína codificada por los genes VCA0261-VCA0260, por otro lado, en una comparación con las proteínas de la base de datos no redundante realizada por BLASTP fue homóloga a 30 proteínas con valores significativos

$$(E = 8 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-94}).$$

Muchas de estas proteínas están anotadas como proteínas de unión a cobre no caracterizadas. Además, fue descrito que el gen VCA0261 es homólogo a un gen presente en



**Fig. 3.** Organización génica de la región de ADN cromosómico que contiene los genes VCA0261 y VCA0260 según TIGR. Entre paréntesis, las coordenadas relativas en pb de los genes representados por saetas. En negro, genes codificadores de proteínas hipotéticas; en gris, genes de proteínas con función reguladora y en blanco, genes con productos génicos de función conocida.

*Pseudomonas fluorescens* relacionado con la resistencia a cobre en este microorganismo.<sup>15</sup>

Los resultados de las búsquedas realizadas permitieron conjeturar que la proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260 estaba relacionada con la resistencia a cobre en *V. cholerae*. La causa de la sobre-expresión de esta proteína en condiciones de anaerobiosis no está clara. Ha sido descrito que en estas circunstancias el cobre se encuentra como cobre (I), el cual es más tóxico que el cobre (II), por lo tanto, los mecanismos homeostáticos son activados.<sup>16</sup> El medio utilizado para el cultivo de las células analizadas por proteómica (Syncase) no se suplementó con cobre; sin embargo, su posible introducción como contaminante en la solución de sales que se usó como suplemento no se descarta.

#### Construcción de un mutante de *V. cholerae* en el gen VCA0261-VCA0260

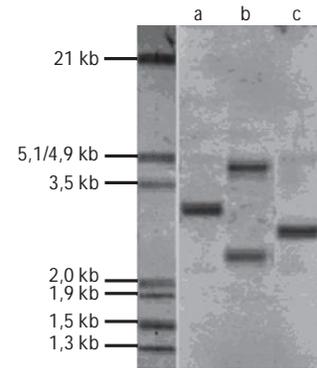
Con el fin de poder determinar la posible función de la proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260 en la homeostasis al cobre de *V. cholerae* se construyó un mutante derivado de la cepa C7258 carente del gen VCA0261-VCA0260 en su cromosoma. Como el gen VCA0261-VCA0260 probablemente forma un operón con los genes adyacentes, al realizar la supresión se tuvo en cuenta no alterar el marco de lectura para evitar posibles efectos polares en los genes cuesta abajo.

Utilizando la técnica de PCR, según los procedimientos descritos en Materiales y Métodos, los tres primeros codones de VCA0261 se fusionaron a los últimos 12 de VCA0260, incluyendo al codón de parada de este último. El fragmento de cerca de 1,7 kb resultante se chequeó por digestión individual con las enzimas *DraI*, *BclI*, *NruI* y *SphI*, con lo que se obtuvo en cada digestión los fragmentos esperados. Para verificar si durante las reacciones de amplifi-

cación no se introdujo ningún error, el fragmento que contenía la fusión se secuenció, para lo cual, se obtuvo primeramente el plasmidio pIJ  $\Delta$ VCA0261-0260, según lo explicado en *Materiales y Métodos*. La secuenciación nucleotídica del fragmento insertado en este plasmidio, mostró que las regiones flanqueantes al gen VCA0261-VCA0260 estaban fusionadas en la misma orientación en que se encuentran en el cromosoma 2 de *V. cholerae* y que del interior de la secuencia se había suprimido al gen VCA0261-VCA0260, quedando tan solo los tres primeros codones del gen VCA0261 y los últimos 12 pertenecientes al VCA0260, coincidente con lo esperado. El fragmento *BglII*-*XbaI* de 1,66 kb presente en el pIJ  $\Delta$ VCA0261-0260 se clonó en el pVCD442, según lo descrito en *Materiales y Métodos*, con lo que se obtuvo el plasmidio suicida pCV- $\Delta$ VCA0261-0260.

El plasmidio pCV- $\Delta$ VCA0261-0260 se introdujo en *V. cholerae* C7258 mediante conjugación según lo explicado en *Materiales y Métodos*. La estructura génica de los cointegrantes y segregantes se evaluó por digestión de sus ADN cromosómicos con la enzima *HindIII* e hibridación de *Southern blot*. En el caso de la cepa salvaje la digestión del ADN cromosómico con esta enzima generó una banda de ~ 3,1 kb, coincidente con lo esperado (Fig. 4a); mientras que los tres cointegrantes evaluados produjeron dos bandas de ~ 2,2 y 4,6 kb (Fig. 4b, tan solo se muestra el resultado para uno de los cointegrantes). Este patrón indica que la inserción del plasmidio en los cointegrantes ocurrió por la región cuesta abajo del gen VCA0261-VCA0260. Por último, la digestión con *HindIII* del ADN cromosómico de los segregantes carentes del gen VCA0261-VCA0260 en su genoma generó una banda de ~ 2,7 kb. De los diez segregantes evaluados solo uno, C7258  $\Delta$ VCA0260-0261-2<sub>3</sub>, resultó

portar esta supresión (Fig. 4c). A continuación, se analizó la sensibilidad al cobre de la cepa salvaje C7258 y su mutante  $\Delta$ VCA0260-0261-2<sub>3</sub>.

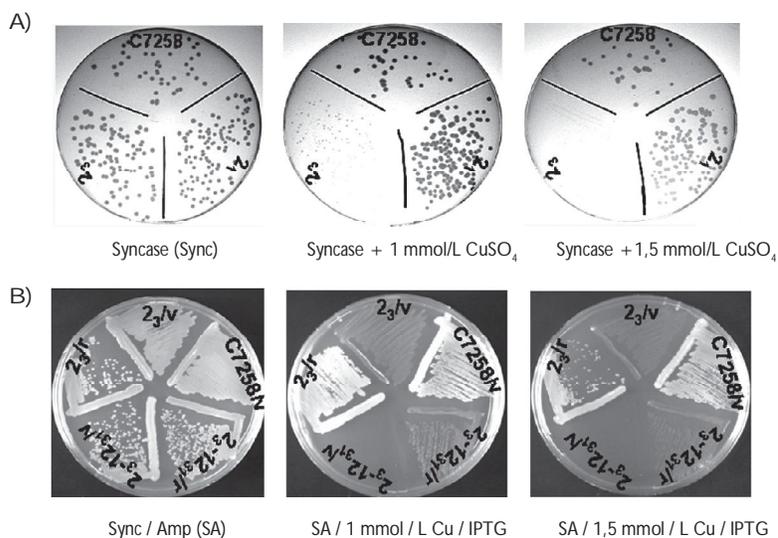


**Fig. 4.** Análisis por *Southern blot* de la estructura génica de los cointegrantes y segregantes obtenidos durante la construcción del mutante en el gen VCA0261-VCA0260. Se usó como sonda el fragmento *BglII* de cerca de 1,7 kb del plasmidio pIJ- $\Delta$ VCA0260-0261. Los ADN cromosómicos de las diferentes cepas se digirieron con *HindIII*. a, C7258; b, cointegrante con pCV- $\Delta$ VCA0260-0261 y c, mutante  $\Delta$ VCA0260-0261-2<sub>3</sub>. A la izquierda, el marcador de peso molecular de ADN del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII* y *EcoRI*. El tamaño de las bandas se expresa en kb.

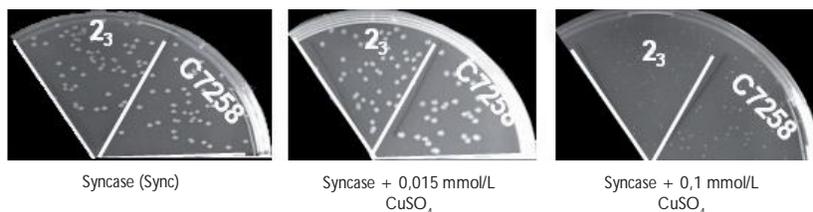
#### Sensibilidad de *V. cholerae* al cobre y papel del gen VCA0261-VCA0260 en la resistencia a este metal

La sensibilidad al cobre de *V. cholerae* se determinó en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. El sistema utilizado para la generación de los ambientes anaeróbicos (Sacos Anaerogen en jarra Oxoid cerrada) no permite determinar las velocidades de crecimiento de los microorganismos en medio líquido, ya que no admite extraer muestras durante el cultivo sin afectar el ambiente anaeróbico existente. Por esta razón se decidió evaluar la sensibilidad al cobre de las diferentes cepas en medio Syncase sólido. Como control de los experimentos, se usó la cepa salvaje C7258 y un segregante derivado del mismo cointegrante del cual se obtuvo el mutante  $\Delta$ VCA0261-0260-2<sub>3</sub>, pero que luego del proceso de segregación mantuvo una copia salvaje del gen VCA0261-VCA0260 (2<sub>1</sub>).

En condiciones aeróbicas, la cepa de *V. cholerae* C7258 no creció en 4 mmol/L de CuSO<sub>4</sub>. En 2 mmol/L, por otro lado, el crecimiento se afectó, observándose variación en la morfología y tamaño de las colonias respecto al control crecido en ausencia de CuSO<sub>4</sub>. En 1,5 mmol/L sin embargo, el crecimiento se afectó menos (Fig. 5A).



**Fig. 5. A)** Sensibilidad a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  en condiciones de cultivo aerobias de las cepas de *V. cholerae* C7258, y su derivado  $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$ . Como control se usó un segregante derivado del mismo cointegrante, del cual se obtuvo el mutante  $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  con una copia salvaje del gen  $\text{VCA0261-VCA0260}$ ,  $2_3$ . **B)** Análisis de complementación del mutante  $\text{C7258}\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  transformado con el vector  $\text{pIJ2921}$ ,  $2_3/v$  o con el plasmidio  $\text{pIJ-N830-1}$ ,  $2_3/r$ . Como controles se usaron la cepa C7258 transformada con el plasmidio  $\text{pIJ2921}$ ,  $2_3-12_3/v$  y el mutante en el gen  $\text{copA}$ , *V. cholerae*  $2_3-12_3$ , transformada con el vector  $\text{pIJ2921}$ ,  $2_3-12_3/r$  y con el plasmidio  $\text{pIJ-N830-1}$ ,  $2_3-12_3/r$ .



**Fig. 6.** Sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* C7258 y su derivado  $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$ , a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  en condiciones de cultivo anaerobias.

Esto coincide con lo observado en *E. coli*, para el cual 2 mmol/L de  $\text{CuSO}_4$  permite el crecimiento del microorganismo, pero a una velocidad de duplicación menor.<sup>17</sup>

En el caso del mutante  $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  en 2 mmol/L de  $\text{CuSO}_4$  se afectó notablemente el crecimiento de sus colonias, lo que fue observado tan solo a contraluz. En 1,5 mmol/L la afectación del crecimiento fue también muy notable aunque en este caso, las colonias pudieron ser vistas (Fig. 5A). En 1,0 mmol/L, por otro lado, las colonias disminuyeron de tres a cuatro veces su tamaño respecto a la cepa parental (Fig. 5A). Estos resultados sugieren que la proteína codificada por el gen  $\text{VCA0261-VCA0260}$  desempeña un papel importante en la homeostasis a cobre en *V. cholerae*, al menos en concentraciones elevadas de este compuesto y condiciones aerobias. Sin embargo, esta proteína no

debe formar parte de un mecanismo fundamental en la resistencia a este compuesto, ya que el mutante crece normalmente en concentraciones de cobre de 0,5 mmol/L. Por otra parte, el otro segregante derivado del mismo co-integrante a partir del cual se obtuvo el mutante  $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$ ,  $2_3/r$ , mostró el mismo patrón de sensibilidad que la cepa salvaje C7258 (Fig. 5A), lo que sugiere que el aumento de la sensibilidad observada en el mutante se relaciona con la mutación introducida en el gen  $\text{VCA0261-VCA0260}$ . La complementación del mutante  $\text{C7258}\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  con el plasmidio  $\text{pIJ-N830-1}$  restauró su capacidad para crecer en concentraciones de cobre de 1,5 mmol/L, por lo que se descartó que la sensibilidad aumentada al cobre se debiera a una mutación introducida inadvertidamente en otro gen (Fig. 5B). En ese mismo experi-

mento, el control negativo (una cepa que posee una segunda mutación en  $\text{CopA}$ , la ATPasa transportadora de cobre, esencial en la resistencia a este compuesto) no creció en presencia de cobre, aun cuando contenía al plasmidio  $\text{pIJ-N830-1}$ , indicativo de la especificidad en la complementación del mutante  $\text{C7258}\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  (Fig. 5B).

En ambiente anaerobio, por otra parte, la cepa salvaje C7258 no creció en 200  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$ , mientras que en 100  $\mu\text{mol/L}$  disminuyó el tamaño de las colonias notablemente (Fig. 6). En 40  $\mu\text{mol/L}$  el tamaño de las colonias disminuyó a la mitad respecto al control crecido sin suplemento de cobre y en 15  $\mu\text{mol/L}$ , no se afectó el crecimiento (Fig. 6). El aumento de la sensibilidad al cobre de *V. cholerae* en condiciones de cultivo anaerobias (10 veces), respecto a las aeróbicas, coincidió con reportes previos para otros microorganismos.<sup>16</sup>

Las colonias de la cepa del mutante, por otra parte, en 100  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$  alcanzaron la mitad del tamaño de las colonias de la cepa salvaje (Fig. 6). En 40  $\mu\text{mol/L}$  se afectó el crecimiento respecto al control crecido sin suplemento de cobre, pero comparado con la cepa parental esta afectación fue muy pequeña. Estos resultados sugieren que el papel desempeñado por la proteína codificada por el gen  $\text{VCA0261-VCA0260}$  en la resistencia a cobre de *V. cholerae* en condiciones de anaerobiosis es menor que en aerobiosis, lo que pudiera estar relacionado con que en estas condiciones sean más importantes otros mecanismos de resistencia a cobre, como ha sido descrito para *E. coli*<sup>18</sup> y sería consecuente con el bajo nivel de expresión detectado para esta proteína en anaerobiosis en el trabajo de proteómica, aun cuando sobre-expresada respecto a la condición de aerobiosis.<sup>3</sup> Por otro lado, en el experimento de proteómica, en la condición de aerobiosis, la concentración de cobre pudiera haber sido muy baja, lo que no permitió la inducción de la expresión de esta proteína.

#### Evaluación de la capacidad colonizadora de *V. cholerae* C7258 y el mutante $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$ en ausencia y presencia de cobre

Con vistas a determinar el posible papel del gen  $\text{VCA0261-VCA0260}$ , *in vivo*, se evaluó la capacidad colonizadora de *V. cholerae* C7258- $\Delta\text{VCA0261-0261-2}_3$  en el modelo del ratón lactante. Se ha descrito que

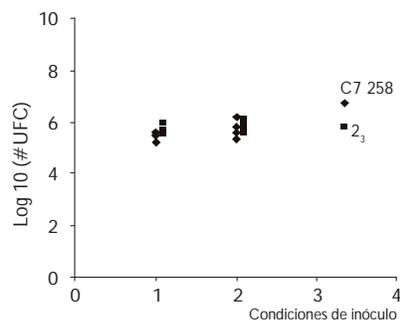
en las condiciones anaeróbicas y ligeramente ácidas del intestino humano, los sistemas de resistencia a cobre pudieran desempeñar un papel importante en la supervivencia de los enteropatógenos al encontrarse concentraciones de hasta 10  $\mu\text{mol/L}$  de cobre en este compartimiento.<sup>16</sup> Por esta razón, se evaluó la colonización del mutante en presencia de 10  $\mu\text{mol/L}$  de cobre y se comparó con el nivel de colonización en ausencia de cobre. La cepa salvaje mantuvo los mismos niveles de colonización en 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$  respecto al inóculo en ausencia de este compuesto, al igual que el mutante C7258- $\Delta\text{VCA0261-0260-2}_3$  (Fig. 7). Estos resultados muestran que, al menos en este modelo de colonización de *V. cholerae*, la proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260 no desempeña un papel importante en la colonización de este microorganismo, incluso en presencia de 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

## CONCLUSIONES

Los genes VCA0260 y VCA0261 del cromosoma 2 de *V. cholerae* N16961 constituyen un único gen, que codifica para una proteína relacionada con la homeostasis al cobre. En condiciones de aerobiosis y elevada concentración de cobre, la contribución de esta proteína a la resistencia a este ión es muy importante; en anaerobiosis, sin embargo, la contribución no es tan evidente. La proteína codificada por el gen VCA0261-VCA0260, por otro lado, no desempeña un papel importante en la colonización de *V. cholerae* en el modelo del ratón lactante.

## BIBLIOGRAFIA

1. Reidl J. and Klose K.E. *Vibrio cholerae* and cholerae: out of the water and into the host. **FEMS Microbiol. Rev.**, **26**, 125, 2002.
2. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J.,



**Fig. 7.** Colonización de las cepas de *V. cholerae* C7258 y el mutante  $\Delta\text{VCA0261-0260-2}_3$  inoculadas en ausencia (1) y con 10  $\mu\text{mol/L}$  (2) de  $\text{CuSO}_4$ .

*et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, **406**, 477, 2000.

3. Marrero K., Sánchez A., Rodríguez-Ulloa A., González L.J., Castellanos-Serra L., Paz-Lago D. *et al.* Proteome analysis of *V. cholerae* grown in oxygen-deprived and aerobic environments. **Proteomics**, en prensa.
4. Xu Q., Dziejman M. and Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *V. cholerae* during intraintestinal growth and mixexponential phase *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **100**, 1286, 2003.
5. Janssen G.R. and Bibb M.J. Derivatives of pUC18 that have *Bgl*II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. **Gene**, **124**, 133, 1993.
6. Valle E., *et al.* Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholerae vaccine candidate derived from strain 638. **Infect. Immun.**, **68**, 6411, 2000.
7. Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic. Acid. Res.**, **16**, 6127, 1988.
8. Stoebner J.A. and Payne S.M. Iron regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *V. cholerae*. **Infect. Immun.**, **56**, 2891, 1988.

9. Ausubel F.M., *et al.* Short protocols in molecular biology, 3rd Ed, John Wiley & Song Inc., New York, USA, 1995.
10. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
11. Chomazynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Analyt. Biochem.**, **201**, 134, 1992.
12. Mey A.R., Wyckoff E.E., Oglesby A.G., Rab E., Taylor R.K. and Payne S.M. Identification of the *Vibrio cholerae* Enterobactin Receptors VctA and IrgA: IrgA Is Not Required for Virulence. **Infect. Immun.**, **70**, 3419, 2002.
13. Ermolaeva M.D., White O. and Salzberg S.L. Prediction of Operons in Microbial Genomes. **Nucleic Acids Res.**, **29**, 1216, 2001.
14. The Institute of Genome Research. Comprehensive microbial resource. Disponible en: [http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/operongeneage.spl?db=108&locus=VCA0260&display=VC\\_A0260](http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/operongeneage.spl?db=108&locus=VCA0260&display=VC_A0260). (Consultado: 11 de abril de 2004).
15. Tom-Peterson A., Hosbon C. and Nybroe O. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. **FEMS Microbiol. Ecol.**, **38**, 59, 2001.
16. Rensin C. and Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, **27**, 197, 2003.
17. Kershaw C.J., Brown N.L., Constantinidou C., Patel M.D. and Hobman J.L. The expression profile of *Escherichia coli* K-2 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. **Microbiology**, **151**, 1187, 2005.
18. Outtent F.W., Huffman D.L., Hale J.A. and O'Halloran T.V. The independent Cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **276**, 30670, 2001.