

El plasmidio críptico pTLC de *Vibrio cholerae* podría ser un vestigio evolutivo del genoma de un fago filamentososo

Lourdes Proenza, Edith Suzarte, Talena Ledón, Karen Marrero, Boris Luis Rodríguez, Rafael Fando y Javier Campos.*

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 19 de septiembre de 2006. Aceptado: 21 de noviembre de 2006.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, elemento genético TLC, transferencia horizontal de genes, fago filamentososo, CTX ϕ , VGJ ϕ .
Key words: *Vibrio cholerae*, TLC genetic element, horizontal gene transfer, filamentous phage, CTX ϕ , VGJ ϕ .

RESUMEN. El elemento críptico ligado a la toxina (TLC, del inglés, *toxin-linked cryptic*) es una secuencia duplicada en tándem de alrededor de 4,7 kb localizada cuesta arriba del profago CTX ϕ en el cromosoma de *Vibrio cholerae*. TLC se encuentra en la mayoría de las cepas de *V. cholerae* que expresan la toxina colérica y el *pilus* corregulado con la toxina, dos factores de virulencia esenciales en este microorganismo. Algunos descubrimientos previos sugieren que TLC está relacionado con los bacteriófagos. Así, la proteína de replicación Cri de TLC, es similar a la proteína de replicación de los fagos filamentosos Ff específicos de *E. Coli*. Adicionalmente, ha sido encontrado que TLC está flanqueado por secuencias *att* muy similares a las que flanquean al profago CTX ϕ . En este estudio, se demuestra que la forma replicativa plásmidica de TLC puede generar un genoma de ADN de cadena simple circular que puede ser empaquetado en la cápsida del fago VGJ ϕ cuando TLC y VGJ ϕ coexisten en la misma célula. Las partículas de fago resultantes transmiten el genoma de TLC horizontalmente entre cepas de *V. cholerae* que expresan el *pilus* MSHA, el mismo receptor utilizado por VGJ ϕ . Una vez dentro de la célula infectada, el genoma de TLC es convertido nuevamente en la forma replicativa (FR) de ADN de cadena doble, la cual puede replicarse o integrarse en el cromosoma de la bacteria. Este resultado sugiere que TLC es un vestigio evolutivo de un fago filamentososo que se designa como TLC ϕ , el cual probablemente fue adquirido por *V. cholerae* previamente a CTX ϕ .

ABSTRACT. The toxin-linked cryptic (TLC) element is a tandem duplicated sequence of about 4.7 kb located upstream to the CTX ϕ -prophage in *Vibrio cholerae* chromosome. TLC is found in most strains of *V. cholerae* expressing cholera toxin and toxin coregulated *pilus*, two essential factors for virulence of this organism. The role of TLC in *V. cholerae* pathogenesis or evolution is unknown. Some previous findings suggest that TLC is related to bacteriophages. Thus, the Cri replication protein of TLC, is similar to the replication protein of a *Escherichia coli* F-specific filamentous bacteriophages. Additionally, it has been found that TLC is in both, integrated and extrachromosomal replicating forms, and more recently it was reported that TLC is flanked by *att* sequences highly similar to those flanking CTX ϕ -prophage. In this study it's demonstrate that TLC can generate a single-stranded DNA form during its replication, which can be packed into phage VGJ ϕ capsids when TLC and VGJ ϕ coexist at the same cell. The resultant phage particles transmit the TLC genome horizontally among strains of *Vibrio cholerae* that express MSHA pili, the same receptor used by VGJ ϕ . Once inside the cell, TLC genome is converted to a double-stranded DNA

replicative form, which can replicate or be integrated in the bacteria chromosome. These findings strongly suggest that TLC is the vestige of a filamentous phage it was designated TLC ϕ , which was probably acquired by *Vibrio cholerae* previous to CTX ϕ .

INTRODUCCION

El cólera es un síndrome clínico epidémico causado por la bacteria Gramnegativa *Vibrio cholerae*, usualmente de los serogrupos O1 y O139.¹ Esta bacteria produce dos elementos esenciales para su virulencia: la toxina colérica, la cual es la principal responsable de las severas diarreas producidas durante el transcurso de la enfermedad, y el *pilus* corregulado con la toxina (TCP, del inglés, *toxin coregulated pilus*), que es esencial para la colonización del intestino.² La toxina colérica está codificada por el operón *ctxAB*, que se encuentra dentro del genoma del fago lisogénico filamentososo CTX ϕ .² Por tanto, los genes de la toxina pueden ser transmitidos horizontalmente mediante el fago CTX ϕ entre diferentes poblaciones bacterianas de *V. cholerae* que expresen la fimbria TCP, que además de ser el principal factor de colonización actúa como receptor de CTX ϕ en la superficie celular.³

Correspondencia:

Dirección: Dpto. de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de la Habana, Cuba. Teléfono: (537) 2085236 ext 248, Correo electrónico: javier.campos@cnic.edu.cu

Las cepas toxigénicas conocidas de *V. cholerae* contienen al fago CTX ϕ integrado en el genoma en una o más copias en tándem formando diversos arreglos con o sin su fago satélite denominado RS1 ϕ , en dependencia de la cepa o el biotipo.² Las cepas toxigénicas de *V. cholerae* contienen además, un plasmidio de 4,7 kb de bajo número de copias llamado plasmidio críptico ligado a la toxina (pTLC, del inglés *toxin-linked cryptic plasmid*) cuya función no se conoce. Este plasmidio se encuentra generalmente integrado en dos copias repetidas en tándem inmediatas al extremo 5' del profago CTX ϕ en el cromosoma I de la bacteria, pero se encuentra ausente en las cepas ambientales no toxigénicas de *V. cholerae* que carecen del profago CTX ϕ .⁴

El elemento TLC contiene un marco abierto de lectura (ORF, del inglés, *open reading frame*), llamado *cri* (por sus siglas en inglés, *cryptic replication initiation*) sobre el cual se ha predicho que codifica una proteína similar a la proteína iniciadora de la replicación de los fagos filamentosos Ff

de *E. Coli*.⁴ Esto, junto al hecho de que la forma integrada de TLC está flanqueada por secuencias *att* muy similares a las del profago CTX ϕ , condujo a la hipótesis de que TLC es el vestigio de un fago filamentosos que infectó a *V. cholerae* durante su evolución y se integró en el cromosoma en el sitio *dif*. Este supuesto fago ancestro de TLC, designado TLC ϕ , subsecuentemente devino defectivo por la pérdida de los genes estructurales y de morfogénesis, lo que impidió nuevos eventos de transmisión horizontal de TLC por sí mismo. Una hipótesis alternativa en la misma línea de pensamiento propone que el elemento TLC perdió sus genes estructurales y de morfogénesis por delección en un hospedero desconocido, desde el cual fue transferido a *V. cholerae* en la cápsida ajena de otro fago. Se supone que una vez que el elemento TLC se estableció en *V. cholerae* por cualesquiera de estas vías, la bacteria fue infectada por el fago CTX ϕ , el cual se integró en el sitio *attR*, flanqueante por el extremo 3' de este elemento.⁵

Recientemente, fue descrito que el fago VGJ ϕ de *V. cholerae* es capaz de transmitir horizontalmente el genoma de CTX ϕ y su fago satélite RS1 entre cepas de esta especie bacteriana mediante un nuevo mecanismo de transducción especializada.⁶ Sobre la base de estos antecedentes en este trabajo se propuso evaluar si los fagos CTX ϕ y VGJ ϕ son capaces de transmitir horizontalmente a TLC, así como estudiar si este elemento puede generar una forma genómica de ADN de cadena simple (ADNcs) circular, en busca de evidencias que soporten la hipótesis de que el elemento genético TLC pudiera ser el vestigio de un fago filamentosos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, plasmidios, fagos y medios de cultivo

En este estudio se utilizaron diversas cepas bacterianas, plasmidios y fagos (Tabla 1). Las cepas fueron crecidas en medio LB a 37 °C, ajustado a pH 6,5 o 7,0 cuyos componentes fueron adquiridos de Oxoid (UK). Cuando fue necesario se adicionó kanamicina y ampicilina o una de ellos por separado, a una concentración de 100 μ g/mL .

Tabla 1. Cepas bacterianas, plasmidios y fagos utilizados en el trabajo.

Cepas, plasmidios, fagos	Características	Fuente/Referencia bibliográfica
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac proAB)</i>	Promega
S17- λ pir	<i>RecA thi pro hsdR⁻M⁺ (RP4-2 Tc::Mu::Km::Tn7), λpir (Tp^r, Sm^r)</i>	7
<i>V. cholerae</i>		
569B	Tipo salvaje; serogrupo O1, biotipo clásico, serotipo Inaba	Calcuta, India, 1945
CRC266	Tipo salvaje; serogrupo O139	Bangladesh, 2000
KHT46	Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba, Δ <i>mshA1</i>	8
KHT52	Serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba, Δ <i>tcpA10</i>	8
Plasmidios		
pAOri	Derivado de pGP704 que contiene el OriR6K y el gen de Amp ^r del plasmidio pGP704.	CNIC (Campos, 2001) ^a
pIJ2921	Derivado de pUC18, casi idéntico a este pero con el polilinker flanqueado por sitios <i>Bgl</i> I. Permite selección positiva por colonias blancas y azules.	9
pTLC	Plasmidio críptico de 4,7 kb aislado de la cepa CRC266	Este estudio
pTLC-Amp	TLC marcado con el OriR6K y el gen de Amp ^r del pAOri.	Este estudio
Fagos		
CTX-Kn ϕ	Fago CTX ϕ de <i>V. cholerae</i> marcado con casete de Kn ^r de pUC4K insertado en el sitio único <i>Not</i> I.	6
VGJ ϕ	Fago filamentosos de <i>V. cholerae</i> .	5

^aPlasmidio construido previamente en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas por J. Campos y cols. Resultado no publicado.

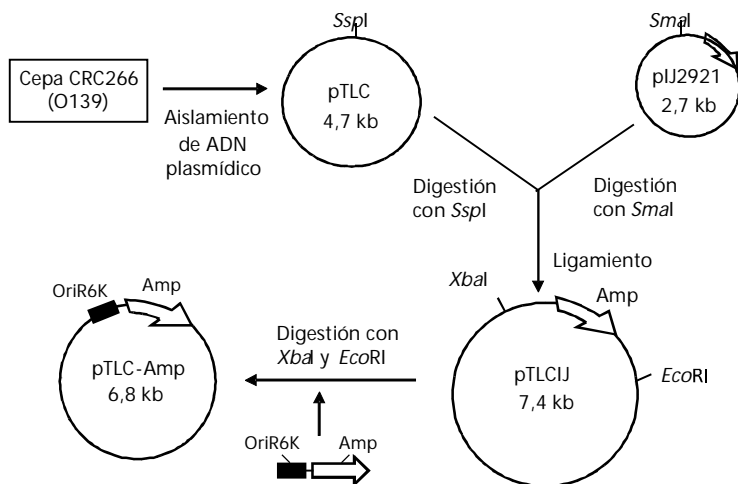


Fig. 1. Construcción del plasmidio pTLC-Amp a partir del plasmidio pTLC aislado de la cepa CRC266, perteneciente al serogrupo O139, de *V. cholerae*.

Técnicas usadas en el trabajo con ADN

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron los sistemas *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* y *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System*, (Promega, EE.UU.). Las reacciones enzimáticas de modificación-restricción de ADN se realizaron teniendo en cuenta las recomendaciones de los proveedores (Promega) y la separación de bandas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa.

La transformación de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó mediante electroporación como fue descrito por Dower y cols. en 1988¹⁰ a 2,5 kV en cubetas de 1 mm de separación entre los electrodos. Para la transformación de *V. cholerae* se utilizó el mismo protocolo, pero con pequeñas modificaciones. En este último caso, las células fueron lavadas tres veces, en lugar de con agua destilada estéril, con la disolución tampón SEB compuesta por 272 mmol/L de sacarosa, 13,4 mmol/L de Na_2HPO_4 y 1 mmol/L de MgCl_2 , ajustada a pH de 7,4. Se trabajó a 2,0 kV en cubetas de 1 mm de separación entre los electrodos.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador PTC150 (MJ Research, EE.UU.) y cada reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 μL , utilizando la *Taq* polimerasa (Promega) y los pares de oligonucleótidos CNC9115 (5'-GCTGATAGCTTACATGGCAC-3') y CNC9116 (5'-CTGTGACTTACTGAAGCGAC-3'), que hibridan a ambos lados del sitio *att* de pTLC-Amp.

La técnica de hibridación de *Southern* se realizó esencialmente según fue descrito por Sambrook y cols.¹¹ La FR de pTLC, digerida con la enzima de restricción *XbaI*, fue aplicada en electroforesis en gel de agarosa y transferida a membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) mediante transferencia alcalina, por capilaridad descendente.¹² Para el marcaje y detección de las sondas se utilizó el sistema no radioactivo *DIG labeling and detection Kit* (Roche, Suiza). Para la obtención de las sondas cadena-específicas utilizadas, se diseñó una PCR asimétrica con los oligos CNC9115 y CNC9116, que permitió generar sondas de ADN de cadena simple (ADNcs) para el reconocimiento específico de cada cadena de ADN del plasmidio pTLC. Esta PCR se realiza con un solo oligonucleótido específico para una de las cadenas del ADN molde en lugar de un par de cebadores como es lo usual y en presencia del desoxirribonucleótido dUTP (35 $\mu\text{mol/L}$) marcado con digoxigenina y de los desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP (100 $\mu\text{mol/L}$) y dTTP (65 $\mu\text{mol/L}$).

El elemento TLC se secuenció parcialmente a partir del plasmidio pTLCIJ utilizando los oligonucleótidos universal (5'-TGTAACGACG-GCCAGT-3') y reverso (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Las reacciones de secuenciación se realizaron con el sistema *Thermo Sequenase CyS Dye Terminator Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) y las secuencias fueron obtenidas con un secuenciador de ADN *ALFexpress* (Amersham Pharmacia Biotech).

El programa BLASTN,¹³ con sus parámetros por defecto, se utilizó para buscar similitud con secuencias nucleotídicas depositadas en las bases de datos internacionales. El programa *Alignment* del paquete de programas *Vector NTI suite 6* se utilizó para realizar los alineamientos de secuencias con los parámetros por defecto del programa.

Construcciones genéticas

El plasmidio críptico pTLC fue aislado de la cepa CRC266. A continuación, se linealizó con la enzima de restricción *SspI*, el fragmento obtenido de 4,7 kb y se insertó mediante ligamiento en el plasmidio pIJ2921 (2,7 kb) previamente linealizado con la enzima *SmaI* (Fig. 1). El nuevo plasmidio obtenido se le denominó pTLCIJ.

El plasmidio pTLCIJ fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* que extraen el fragmento correspondiente al elemento TLC de 4,7 kb. Este fragmento se purificó a partir de gel de agarosa y se insertó mediante ligamiento en el vector pAOri (1,98 kb) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, la construcción genética obtenida fue denominada pTLC-Amp (Fig. 1).

Técnicas usadas en el trabajo con fagos

Para los ensayos de infección la cepa de *V. cholerae* donante del fago se cultivó en medio LB hasta una $\text{DO}_{600} = 1$. Se eliminaron las células de 1 mL de este cultivo mediante centrifugación y filtración del sobrenadante (filtro Sartorius de 0,22 μm). Del sobrenadante libre de células se tomaron 100 μL para infectar $\sim 10^9$ células de un cultivo fresco de la cepa usada como receptora y esta mezcla de infección se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. En el caso de la infección con CTX-Kn ϕ , la cepa receptora se cultivó en medio LB ajustado a pH 6,5 y se incubó a 30 °C para permitir la expresión de TCP, el receptor de CTX ϕ . Pasado el período de incubación, la mezcla de infección se sembró en placas de LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado según el gen de resistencia transducido (Kn o Amp).

Para la purificación de las partículas virales a partir de cultivos infectados, se tomaron 100 mL de un cultivo infectado crecido durante 14 h, se centrifugó y filtró (filtros Sartorius de 0,4 μm). Al filtrado se le añadió

polietilenglicol (PEG) 6000 5 % y NaCl al 3 % (m/v). La mezcla se incubó 30 min en hielo para precipitar las partículas de fago y se centrifugó a 12 000 × g durante 20 min. El sedimento, que contenía las partículas virales, se resuspendió en 1 mL de tampón TE 1X (Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH8) y se trató con la enzima desoxiribonucleasa I para eliminar cualquier resto de ADN contaminante que pudiera quedar fuera de la suspensión de las partículas virales. Se precipitaron nuevamente las partículas virales con NaCl y PEG 6000 como se describió anteriormente y se resuspendieron finalmente en 1 mL de tampón PBS.

El ADNcs genómico viral se obtuvo tratando las partículas de fago purificadas con fenol-cloroformo (1 : 1). Una vez eliminadas las proteínas de la cápsida, el ADN de cadena simple (ADNcs) en la fase acuosa se precipitó con 1/3 de volumen de NH₄Ac y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El ADNcs obtenido en el sedimento se lavó con etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente a 12 000 × g durante 2 min. El ADN fue secado y resuspendido en 100 µL de agua desionizada estéril y se chequeó por electroforesis.

Identificación de *V. cholerae* por inmunoprecipitación

Una colonia fresca de ~2 mm de diámetro de la cepa a caracterizar crecida en LB sólido fue resuspendida en 40 µL de disolución salina (NaCl 0,9 %). Se mezclaron alícuotas de 10 µL de la suspensión celular con igual volumen de los antisueros anti-O139 (título 128), anti-O1 (384), anti-Ogawa (256) o anti-Inaba (128), (Murex Biotech Ltd., UK) y se inspeccionó visualmente la presencia de aglutinación.

RESULTADOS

Aislamiento y secuenciación de pTLC

El plasmidio pTLC fue aislado de la cepa CRC266 del serogrupo O139 de *Vibrio cholerae*, donde este se replica en gran número de copias. La molécula completa de pTLC aislada, de 4,7 kb, se clonó en el vector pIJ2921 y la nueva molécula obtenida se denominó pTLCIJ (Fig. 1). Para comprobar la identidad de la molécula aislada se realizó una secuencia parcial del inserto clonado en pTLCIJ utilizando los cebadores universal y reverso. La

secuencia parcial abarcó 1,9 kb del inserto clonado en pTLCIJ, lo que representó un 40 % de la secuencia total de este (4,7 kb) (Fig. 2) y fue muy similar (identidad de un 91,5 %) a la secuencia de pTLC de la cepa O395P publicada anteriormente⁴ (Número de acceso al GeneBank: AF052650) y a la secuencia del TLC integrada en el genoma de la cepa N16961 (identidad de un 99,2 %) (Fig. 2). Esto demostró que el plasmidio aislado de CRC266 era realmente TLC.

Construcción de una versión marcada de pTLC

Con el objetivo de seguir los posibles eventos de transducción de pTLC, a este elemento se le introdujo un marcador de selección, en este caso, un gen de resistencia a ampicilina (Amp). Para esto, se partió del plasmidio pTLCIJ, del cual se extrajo el fragmento correspondiente al vector pIJ2921 y se substituyó por el casete pAOri que contenía un gen de resistencia a Amp y el origen de replicación OriR6K. La nueva construcción obtenida se denominó pTLC-Amp y estuvo formada por TLC más el gen de resistencia a Amp y el OriR6K (Fig. 1). Este

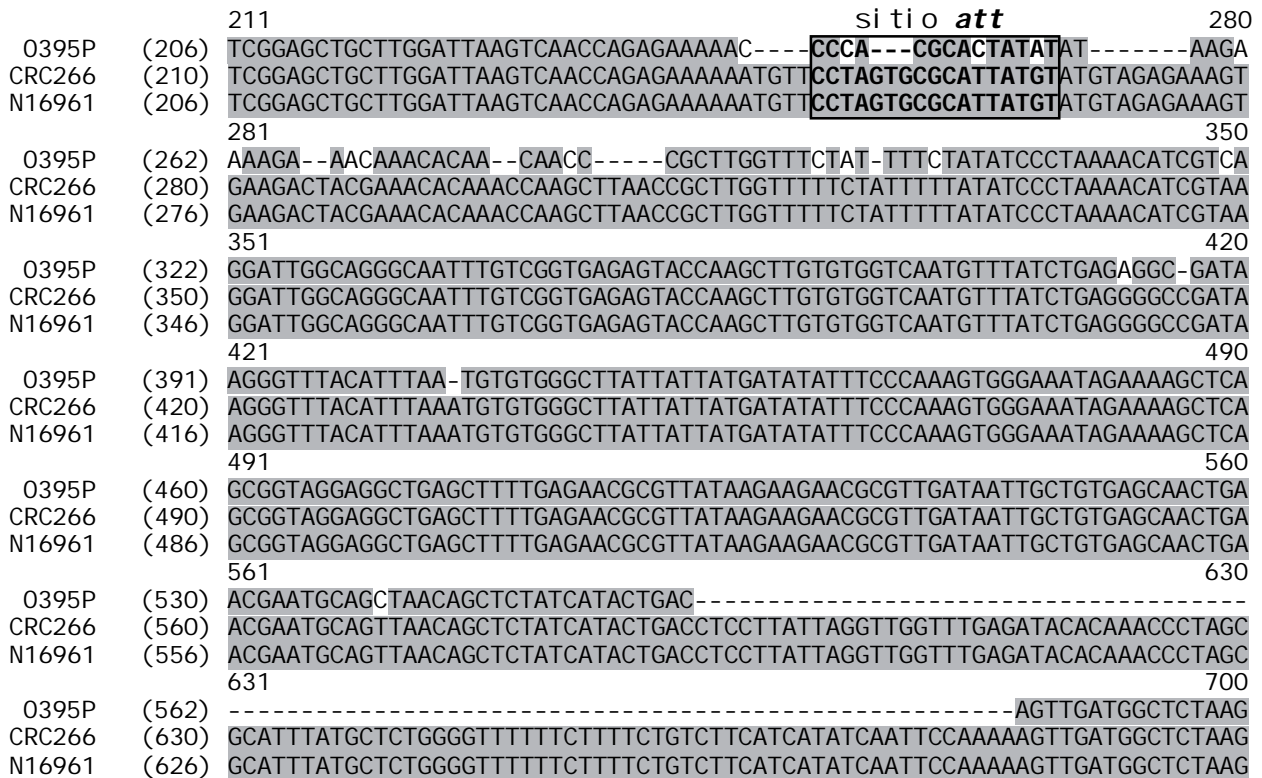


Fig. 2. Alineamiento de un fragmento relevante de la secuencia de pTLC de la cepa CRC266 con los fragmentos correspondientes de pTLC de las cepas O395P y N16961. Las bases idénticas entre cada secuencia se muestran sobre fondo gris. Como puede apreciarse las secuencias provenientes de CRC266 y N16961 son idénticas en este fragmento, sin embargo, la secuencia proveniente de O395P presenta cambios de bases y deleciones, algunas de las cuales afecta al sitio att (que se representa encerrado en un recuadro).

Tabla 2. Transducción de pTLC-Amp hacia diferentes cepas de *V. cholerae*.

Cepas donantes	Número de transductantes Amp ^r de las cepas receptoras		
	569B	KHT52(Δ tcpA10)	KHT46(Δ mshA1)
CRC266(pTLC-Amp)	ND	ND	ND
CRC266(pTLC-Amp/VGJ ϕ)	22(17-26) ^a	31(28-32) ^a	ND
CRC266(VGJ ϕ)	ND ¹	ND ¹	ND ¹

^aNúmero de transductantes Amp^r de la cepa receptora obtenidos después de exponer 10⁸ células a 100 μ L de sobrenadante de cultivo de la cepa donante. El número corresponde al promedio de tres experimentos independientes y entre paréntesis se muestra el intervalo. ND: Ningún transductante Amp^r fue detectado. ¹Aunque no se detectaron transductantes Amp^r cuando se sembró en medio sólido LB-Amp, se comprobó mediante purificación de la forma replicativa de VGJ ϕ que este fago infectó a 569B y KHT52, pero no a KHT46, cuando estas cepas se cultivaron en ausencia de Amp.

origen permite replicar el plasmidio en aquellas cepas de *E. coli* que producen la proteína II (lisógenos de λ pir). Sin embargo, este origen no funciona en *V. cholerae*, por tanto pTLC-Amp se replica en este hospedero a expensas del propio origen de TLC y en *E. coli* λ pir a expensas del OriR6K.

Transducción de TLC con la ayuda de un fago filamentososo

El hecho de que el elemento TLC parece estar relacionado de alguna forma con los fagos filamentosos ha llevado a realizar experimentos para comprobar si TLC es capaz de transmitirse autónomamente, pero los resultados han sido negativos.⁴ Experimentos similares realizados en el laboratorio con cepas diferentes han resultado negativos también. Esto era lógico de esperar si se asume la hipótesis de que TLC es un fago ancestral que ahora es defectuoso por haber perdido los genes que codifican las proteínas de la cápsida y que entró en *V. cholerae* en la cápsida de otro fago filamentososo.

El hecho de que CTX ϕ y pTLC se encuentren integrados uno a continuación del otro en el cromosoma de *V. cholerae* sugirió que tal vez estos elementos genéticos pudieron llegar juntos a esta bacteria. Por tanto, se examinó la posibilidad de que pTLC pudiera ser transducido por CTX ϕ . Para esto, se introdujeron pTLC-Amp y CTX-Kn ϕ (variantes marcadas de estas moléculas con genes de resistencia a Amp y Kn, respectivamente) en una misma célula hospedera. En este caso, se utilizó la cepa 569B. CTX-Kn ϕ se introdujo en esta cepa por infección natural y luego de infectada la cepa, se introdujo el plasmidio pTLC-Amp mediante electroporación. Se cultivó la cepa 569B que contenía ambos elementos para permitir la producción de partículas virales de CTX-Kn ϕ y evaluar la presencia potencial de

partículas virales transductantes de pTLC-Amp. Se tomó sobrenadante filtrado libre de células de este cultivo para infectar otro cultivo virgen de 569B y evaluar la presencia de transductantes resistentes a Amp. A pesar de que se realizaron múltiples intentos, variando las cantidades de sobrenadante filtrado y de células receptoras, no se detectó en ningún caso la presencia de transductantes resistentes a Amp. De todo lo cual se concluyó que CTX ϕ no es capaz de transducir al plasmidio críptico pTLC-Amp, al menos en las condiciones de experimentación utilizadas en este trabajo.

A continuación, se estudió si el fago VGJ ϕ era capaz de transducir a TLC. El fago VGJ ϕ es capaz de transducir el genoma del fago CTX ϕ y esto ocurre cuando los genomas de ambos fagos se recombinan por sus respectivos sitios *att* formando un genoma híbrido que puede transmitirse en la cápsida de VGJ ϕ . Como el plasmidio pTLC posee un sitio *att* en su genoma, se pensó en la posibilidad de que VGJ ϕ también pudiera transducir a pTLC por un mecanismo similar.

Para evaluar esto, la cepa CRC266 del serogrupo O139 fue transformada con la versión marcada pTLC-Amp y posteriormente infectada con VGJ ϕ . Esta cepa, que contiene tanto a pTLC-Amp como a la forma replicativa de VGJ ϕ , se cultivó para permitir la producción de partículas de fago. El sobrenadante filtrado libre de células de este cultivo, que contenía las partículas virales, fue utilizado para infectar un cultivo de la cepa 569B del biotipo clásico de *V. cholerae*. La cepa infectada se cultivó en medio LB sólido con ampicilina para detectar la presencia de transductantes del gen de resistencia a este antibiótico, y por tanto, de pTLC-Amp. Se utilizaron dos controles en el experimento: uno lo constituyó 569B infectada con sobrenadante de cultivo de CRC266

transformada con pTLC-Amp, pero sin infectar con VGJ ϕ , y el otro fue 569B infectada con el sobrenadante de CRC266 infectada con VGJ ϕ (Tabla 2); como puede apreciarse, solo CRC266 transformada con pTLC-Amp e infectada con VGJ ϕ fue capaz de transducir el carácter de resistencia a ampicilina (Amp^r) a la cepa receptora 569B.

Cuando se analizaron las colonias transductantes de 569B obtenidas, se comprobó que estas contenían al plasmidio pTLC-Amp y a la forma replicativa de VGJ ϕ en forma independiente al realizarse un análisis de restricción del ADN plasmídico con la enzima *Xba*I, la cual linealiza ambas moléculas (Fig. 3, carrilera 3). Este resultado fue inesperado, pues se pensaba que de haber transducción de pTLC-Amp esta ocurriría mediante la formación de una molécula híbrida, tal como sucede entre VGJ ϕ y CTX ϕ . Esto se comprobó utilizando ADN plasmídico de los transductantes para electroporar a la cepa S17- λ pir de *E. coli*, en la cual solo

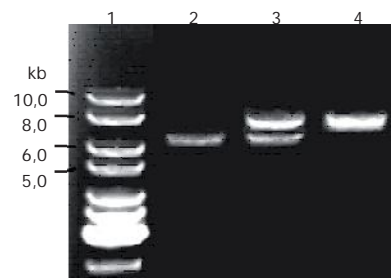


Fig. 3. Electroforesis de ADN donde se muestra que la cepa 569B contiene a pTLC-Amp y a la FR de VGJ ϕ de manera independiente. En la carrilera 1 se aplicó el patrón de tallas moleculares (se muestran las tallas relevantes para el análisis a la izquierda). En las carrileras 2 y 4 se aplicaron los ADNs plasmídicos de pTLC-Amp (6,8 kb) y VGJ ϕ (7,5 kb) digeridos con *Xba*I usados como control, respectivamente. En la carrilera 3 se aplicó ADN plasmídico de un transductante representativo de la cepa receptora 569B también digerido con *Xba*I.

se replica el plasmidio pTLC-Amp por contener el OriR6K, pero no el genoma de VGJ ϕ . Por tanto, se pudo obtener a pTLC-Amp en estado puro de la cepa S17-1 λ pir, lo que corroboró que los transductantes Amp^r obtenidos contenían al plasmidio pTLC-Amp y a la forma replicativa de VGJ ϕ en forma independiente.

Se chequearon los serogrupos de la cepa donadora así como de las colonias transductantes resistentes a ampicilina y se verificó que pertenecían a los serogrupos O139 y O1, respectivamente. Esto descartó que las colonias resistentes obtenidas provinieran de células bacterianas de la misma cepa donadora que atravesaran accidentalmente el filtro utilizado para obtener sobrenadante libre de células. En resumen, estos resultados demuestran que el fago VGJ ϕ , a diferencia de CTX ϕ , sí es capaz de transducir al plasmidio críptico TLC.

El portal de entrada de pTLC a la célula es la fimbria MSHA

Con el objetivo de comprobar si pTLC-Amp era transducido en la cápsida de VGJ ϕ , se diseñó un experimento idéntico al anterior, pero en lugar de utilizar a 569B como cepa receptora, se utilizaron como cepas receptoras el mutante de TCP, KHT52 y el mutante de MSHA isogénico, KHT46. Solo se obtuvieron transductantes Amp^r cuando la cepa donante fue CRC266 (pTLC-Amp/VGJ ϕ) y la receptora KHT52 (Tabla 2, columnas 3 y 4). Sin embargo, el evento de transducción no se detectó cuando la cepa KHT46 se utilizó como receptora. Esta cepa no produce la fimbria MSHA puesto que presenta una delección interna en el gen *mshA* que codifica la pilina principal de la fimbria. Este resultado demuestra que pTLC-Amp se transfirió empaquetado en la cápsida de VGJ ϕ , fago que utiliza como receptor a la fimbria MSHA, de la célula donante a la receptora.

El plasmidio pTLC es capaz de generar una molécula de ADN de cadena simple

Con el objetivo de buscar más evidencias de que el plasmidio críptico pTLC puede constituir un vestigio del genoma de un fago ancestral, se estudió si este elemento genético era capaz de generar una molécula de ADNcs tal como lo hacen los fagos filamentosos a través del mecanismo de replicación por el círculo rodante. Para esto, se diseñó una estrategia combinada

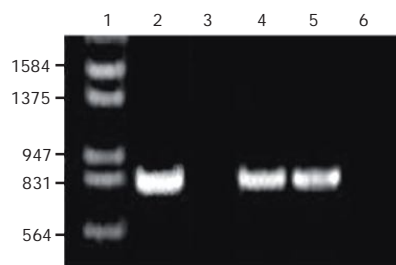


Fig. 4. Electroforesis de ADN de los productos de amplificación utilizando como molde el ADN contenido en las partículas virales producidas por CRC266 (pTLC-Amp/VGJ ϕ) tratado con diferentes enzimas. En la carrilera 1 se aplicó el patrón de tallas moleculares ADN de fago λ digerido con EcoRI y HindIII. En el resto de las carrileras se muestran los productos de las PCR utilizando los pares de oligos CNC9115 y CNC9116 y usando como moldes de amplificación los siguientes: carrilera 2, ADN plasmídico de pTLC-Amp (control positivo); 3, partículas virales intactas producidas por CRC266 (pTLC-Amp/VGJ ϕ) (control negativo); 4, ADNcs purificado de dichas partículas; 5, el mismo ADN anterior, pero tratado con la enzima HindIII y 6, el mismo ADN tratado con nucleasa S1.

mediante PCR y análisis por *Southern blotting*. Primeramente, se realizaron varias reacciones de PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos CNC9115 y CNC9116, los cuales amplifican un fragmento de pTLC-Amp de 828 pb. Como molde de amplificación se utilizaron partículas virales intactas purificadas de la cepa CRC266 (pTLC-Amp/VGJ ϕ) y ADN genómico purificado de estas partículas, intacto o tratado con la enzima de restricción *HindIII* o con nucleasa S1, que degrada el ADNcs. Cuando se utilizaron partículas de fago intactas en la reacción de amplificación no se amplificó ningún fragmento de ADN (Fig. 4, carrilera 3), lo cual es lógico de esperar si el plasmidio pTLC-Amp transducido se transfiere empaquetado en la partícula viral. Cuando se utilizó ADN purificado de las partículas, intacto o tratado con la enzima *HindIII*, se amplificó un fragmento del tamaño esperado, alrededor de 800 pb (Fig. 4, carrileras 4 y 5); sin embargo, el mismo ADNcs tratado con nucleasa S1, impidió que se amplificara dicho fragmento (Fig. 4, carrileras 6). Estos experimentos de amplificación demostraron que el ADN de pTLC-Amp se transduce en forma de ADN de cadena simple puesto que él fue resistente a la acción de la enzima de restricción *HindIII*, que actúa sobre un sustrato de ADN de cadena doble, pero fue sensible a la acción de la

nucleasa S1, que degrada al ADN de cadena simple.

Para comprobar este resultado y además identificar cuál de las cadenas de ADN de pTLC-Amp se empaqueta en la cápsida viral, se diseñó un experimento de *Southern blotting* utilizando sondas de ADN marcadas con digoxigenina capaces de reconocer una cadena de ADN de pTLC-Amp o su complementaria de forma específica. Se utilizaron los oligonucleótidos CNC9115 y CNC9116 que hibridan con ambas cadenas de ADN de la FR de pTLC para generar dos sondas cadena-específicas. Cada oligo se utilizó en una reacción independiente de PCR asimétrico (o sea, en lugar de con un par de oligos, con uno solo) y como ADN molde se usó ADNcs purificado de las partículas virales producidas por la cepa donante CRC266 (pTLC-Amp/VGJ ϕ). Si pTLC se empaquetara en las partículas virales en forma de ADN de cadena doble, entonces se debían generar sondas marcadas tanto con el oligo 9115 como con el 9116, pero si en cambio el ADN de pTLC empaquetado en las partículas fuera de ADN de cadena simple solo uno de los oligos debe generar una sonda marcada y en esto consistió el fundamento del experimento. La o las sondas generadas se utilizarían para reconocer la FR de pTLC en un experimento de hibridación de *Southern blotting*.

Solo uno de los oligos, el CNC9116, fue capaz de generar una sonda marcada que reconoció al ADNcs plasmídico de pTLC en un *Southern blotting* (Fig. 5), lo que indicó que pTLC-Amp era capaz de generar una molécula de ADN de cadena simple, que es la que se empaqueta y transduce por el fago VGJ ϕ . La posibilidad de que el oligo CNC9115 no generara sonda se debiera a un defecto del mismo fue descartada al comprobarse que este sí genera una sonda al utilizarse como molde el ADN plasmídico de cadena doble de pTLC (Fig. 5, carrilera 1).

Es notable que la sonda generada por el oligo CNC9116 reconozca específicamente la cadena positiva de pTLC, o sea aquella que corre en el mismo sentido que la mayoría de los ORFs de TLC, incluyendo el gen *cri* que codifica la proteína de la replicación. Esto demuestra que la cadena positiva de TLC es la que se empaqueta en la cápsida de VGJ ϕ y esta es otra similitud importante de este elemento con los fagos filamentosos.

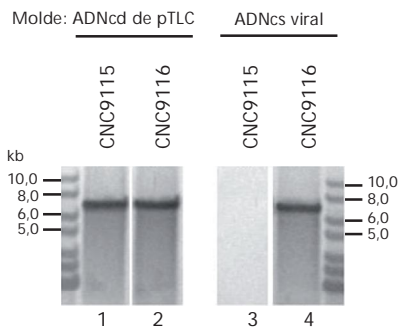


Fig. 5. Análisis mediante Southern blotting que demuestra que lo que se transduce de TLC es la cadena de ADN positiva. En las cuatro carrileras se aplicó ADN plasmídico de pTLC-Amp. En el panel de la izquierda se utilizó ADNcd de pTLC para generar sondas cadena-específicas con los oligos CNC9115 y CNC9116. En el panel de la derecha se usó ADNcs purificado de las partículas virales transductoras de pTLC-Amp con los mismos oligos; solo el oligo CNC9116 generó una sonda cuando se usó este ADN como molde (carril 4).

DISCUSION

El plasmidio críptico pTLC fue aislado de la cepa de *V. cholerae* CRC266 del serogrupo O139. A diferencia de la mayoría de las cepas TLC⁺ de *V. cholerae*, que contienen el plasmidio pTLC en bajo número de copias,⁴ la cepa CRC266 se caracteriza por la producción de un elevado número de copias de pTLC. Esto ha sido observado anteriormente en otra cepa de *V. cholerae*, la O395P del biotipo clásico; pero la causa de que en esta cepa pTLC se replique en mayor número de copias no se conoce.⁴ Se piensa que la causa de que pTLC se replique en gran número de copias en O395P se debe a una mutación en esta cepa y no en pTLC, pues este plasmidio procedente de dicha cepa se replica en bajo número de copias cuando es introducido en otras cepas de *V. cholerae*.⁴ Sin embargo, el plasmidio pTLC, aislado en este trabajo de CRC266, se replica igualmente en gran número de copias cuando es introducido por electroporación en otras cepas de *V. cholerae* como 569B (resultado no mostrado), lo que sugiere que en este caso la mutación responsable de este fenotipo se encuentra en el mismo plasmidio pTLC.

Resulta interesante que la secuencia del pTLC aislada de CRC266 del serogrupo O139 tuvo mayor similitud a la de la cepa N16961, del biotipo El Tor, que a la de la cepa O395P del biotipo clásico (identidad de un 99,2 % para el primer caso, contra un 91,5 %). Esto está en concordancia

con las teorías que proponen que el serogrupo O139 evolucionó a partir del biotipo El Tor.¹⁴ Las diferencias entre la secuencia del pTLC aislada de CRC266 y la de la cepa O395P incluyen varias deleciones en esta última, de las cuales hay una que abarca 92 pb (Fig. 2). El sitio *att* de pTLC, derivado de O395P, fue afectado debido a estas deleciones (Fig. 2), lo cual pudiera tener alguna consecuencia en la biología de pTLC de O395P, pues es por este sitio por donde ocurre la recombinación con el cromosoma bacteriano durante el proceso de integración.

Se demostró que el plasmidio pTLC puede ser transducido por el fago VGJφ cuando ambos elementos se encuentran replicándose en la misma célula hospedera. Inesperadamente, la transducción de pTLC mediada por VGJφ, no ocurre por recombinación sitio-específica de sus genomas, que es el modo en que VGJφ transduce al genoma del fago CTXφ y a su fago satélite RS1. En este caso, todo parece indicar que ocurre un empaquetamiento alternativo de la cadena positiva de ADN circular de pTLC, en la cápsida del fago VGJφ. Un mecanismo similar fue propuesto recientemente por Faruque y cols. (2005) para explicar la transducción de RS1 con la ayuda del fago KSF-1. Estos resultados ofrecen una explicación plausible de como el elemento TLC pudo ser adquirido por *V. cholerae*.

Se pudo demostrar que la manera en que pTLC es transducido ocurre por empaquetamiento de la cadena positiva circular de este elemento. Aunque indirecta, esto constituye la primera evidencia de que TLC pudiera replicarse por el mecanismo del círculo rodante y constituye además una evidencia muy fuerte de que la hipótesis de que TLC es el vestigio de un fago ancestral pudiera ser correcta, ya que los fagos filamentosos presentan un genoma de ADN de cadena simple positiva circular que se genera por el mecanismo del círculo rodante y se empaqueta en la partícula fágica. Si esta hipótesis es correcta un aspecto de interés es si el fago ancestral hipotético TLCφ desapareció durante la evolución, o si su descendencia se ha mantenido hasta la actualidad en algún hospedero desconocido.

Un aspecto interesante es el referente a la función que desempeña el elemento TLC y su relación con el fago CTXφ. Si realmente TLC es un vestigio del genoma de un fago

filamentoso, el papel que desempeña este elemento en la biología de *V. cholerae* y su relación con la virulencia es enigmático. Es significativo el hecho de que TLC solo se ha encontrado integrado en las cepas toxigénicas de *V. cholerae* en asociación directa con el profago CTXφ. Se ha especulado que TLC puede ser importante en la biología de CTXφ, ya sea porque su adquisición por *V. cholerae* haya sido un requisito previo a la adquisición de CTXφ o porque este aporte alguna función imprescindible para la replicación de CTXφ.⁴ Pudiera ser que TLC sea un elemento neutral que no sea importante para la biología de *V. cholerae* ni para la de CTXφ, pero si esto es así cabe preguntarse porque se ha mantenido en el transcurso de la evolución de esta bacteria patógena.

CONCLUSIONES

El plasmidio críptico pTLC puede transmitirse entre células bacterianas de *V. cholerae* con la ayuda del fago filamentosos VGJφ. Esto ocurre mediante el empaquetamiento de pTLC en la cápsida de dicho fago y por tanto la vía de entrada de pTLC a la célula es la fimbria MSHA, que es el receptor de VGJφ. Además, pTLC es capaz de generar una molécula de ADNcs circular positiva, que es la que se empaqueta en la cápsida de VGJφ. Estos resultados constituyen evidencias que apoyan la hipótesis que propone que pTLC es el vestigio evolutivo de un fago filamentosos ancestral que infectó a *V. cholerae* previamente a la adquisición del fago CTXφ.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaper J.B., Morris J.G., Jr. and Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 48-86, 1995.
2. Davis B.M. and Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 35-42, 2003.
3. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, **272**, 1910-1914, 1996.
4. Rubin E.J., Lin W., Mekalanos J.J. and Waldor M.K. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol. Microbiol.*, **28**, 1247-1254, 1998.
5. Campos J., Martínez E., Suzarte E., Rodríguez B.L., Marrero K., Silva Y. *et al.* VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. *J. Bacteriol.*, **185**, 5685-5696, 2003.
6. Campos J., Martínez E., Marrero K., Silva Y., Rodríguez B.L., Suzarte E. *et al.* Novel type of specialized trans-

- duction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 7231-7240, 2003.
7. Miller V.L. and Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. **J. Bacteriol.**, **170**, 2575-2583, 1988.
 8. Thelin K.H. and Taylor R.K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. **Infect. Immun.**, **64**, 2853-2856, 1996.
 9. Mendez C. and Chater K.F. Cloning of whiG, a gene critical for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, **169**, 5715-5720, 1987.
 10. Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, **16**, 6127-6145, 1988.
 11. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 9.31-9.59, 1989.
 12. Chomczynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Anal. Biochem.**, **201**, 134-139, 1992.
 13. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, **25**, 3389-3402, 1997.
 14. Dumontier S., Trieu-Cuot P. and Berche P. Structural and functional characterization of IS1358 from *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **180**, 6101-6106, 1998.