

Aislamiento y caracterización de un nuevo fago filamentososo de *Vibrio cholerae* capaz de transducir los genes de la toxina colérica.

Yovanny Izquierdo, 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: 14 de mayo de 2003. Aceptado: 26 de marzo de 2004.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, transferencia horizontal de genes, fago filamentososo.
Key words: *Vibrio cholerae*, horizontal gene transfer, filamentous phage.

RESUMEN. Un nuevo bacteriófago filamentososo, designado VEJ ϕ , se aisló de la cepa de *Vibrio cholerae* MO45 del serogrupo O139. Se realizó una caracterización molecular preliminar de este fago, que incluyó la secuenciación de su genoma completo, el estudio de la estructura genómica y la identificación del receptor del fago, así como del gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida mediante la secuenciación de la región amino terminal de esta última. La secuencia nucleotídica del genoma de VEJ ϕ , de 6842 bp, reveló que presenta una organización modular de genes funcionalmente relacionados, que es característica del género de los inovirus (fagos filamentosos). VEJ ϕ está estrechamente relacionado con otros fagos filamentosos de *Vibrio cholerae* descritos previamente, entre los que se incluyen VGJ ϕ , VSK y fs1. Al igual que estos últimos, VEJ ϕ utiliza como receptor celular a la fimbria de tipo IV denominada hemaglutinina sensible a manosa (MSHA). Se demostró que VEJ ϕ , al igual que el fago VGJ ϕ , es capaz de transmitir horizontalmente el genoma del fago CTX ϕ y por tanto, los genes de la toxina colérica entre poblaciones bacterianas de *Vibrio cholerae* que expresan la fimbria MSHA. Los resultados del presente trabajo sugieren que la variedad de fagos implicados en los eventos de transmisión horizontal de los genes de la toxina colérica puede ser mayor de lo que se pensaba.

ABSTRACT. A novel filamentous bacteriophage, designated VEJ ϕ , was isolated from the strain MO45 of *Vibrio cholerae* of the O139 serogroup. A preliminary molecular characterization of the phage was carried out, which included the sequencing of its whole genome, the study of the genomic structure and the identification of the phage receptor as well as the gene encoding the major capsid protein by sequencing of its amino terminal region. The genome nucleotide sequence of VEJ ϕ , which consists of 6842 bp, revealed that it is organized in modules of functionally related genes in an array which is characteristic of the genus inovirus (filamentous phages). VEJ ϕ is closely related with other previously described filamentous phages of *Vibrio cholerae*, including VGJ ϕ , VSK and fs1. Like these phages, VEJ ϕ uses as a cellular receptor the type IV pilus called mannose sensitive hemagglutinin (MSHA). It was also demonstrated that VEJ ϕ , like the phage VGJ ϕ , is able to transmit the genome of the phage CTX ϕ horizontally between bacterial populations of *Vibrio cholerae* expressing the pilus MSHA receptor and therefore the genes encoding the cholera toxin. This suggests that the variety of phages implicated in the horizontal transmission of the cholera toxin genes could be more diverse than formerly thought.

INTRODUCCION

Los bacteriófagos (fagos) filamentosos son virus pertenecientes al género *Inovirus* que se asemejan a largas varillas flexibles de alrededor de 800 a 2 000 nm de largo por 6 nm de diámetro.¹ Cuentan con un genoma circular de ADN de cadena simple (ADNcs) de entre 5 000 y 8 000 bases, en el que se codifican alrededor de 10 genes, y sus hospederos son casi exclusivamente bacterias gramnegativas.¹ En su entorno natural muchos de estos fagos son capaces de transmitir porciones de genoma foráneo entre las poblaciones bacterianas a las que infectan, lo cual es un ejemplo del fenómeno más general conocido como transferencia genética horizontal.²

Específicamente en *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*), la bacteria causante del cólera, han sido descritos diversos mecanismos mediados por fagos filamentosos que implican la transmisión de genes relacionados con la virulencia de este patógeno, los cuales han marcado profundamente la óptica de estudio del mismo. El más trascendente fue el descubrimiento de que los genes que codifican la toxina del cólera,

Correspondencia:

* Departamento 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

principal factor de virulencia de *V. cholerae*, formaban parte del genoma del fago filamentoso integrativo CTX ϕ , y no del de la bacteria, como se pensaba anteriormente.³ El receptor de este fago es TCP (del inglés *toxin coregulated pilus*), una fimbria de tipo IV que es además un factor esencial en la colonización intestinal de *V. cholerae*.³ Los genes requeridos para la expresión de TCP se encuentran en una región del cromosoma llamada VPI (del inglés *Vibrio pathogenicity island*) que también parece ser un elemento adquirido horizontalmente por el patógeno durante su evolución, si bien la vía de transmisión aún es discutida.^{4,5}

Más recientemente se describió otro fago filamentoso, VGJ ϕ , capaz de transmitir los genes de la toxina colérica por un nuevo mecanismo de transducción especializada, y que utiliza como receptor la fimbria tipo IV denominada hemaglutinina sensible a manosa (MSHA).^{2,6} El genoma de VGJ ϕ es capaz de recombinarse con el del fago CTX ϕ , cuando ambos coinfectan a la misma célula. El genoma híbrido así formado se empaqueta en la cápside de VGJ ϕ formando el fago híbrido HybP ϕ , capaz de infectar otras células a través del receptor MSHA, y de replicarse en ellas.² CTX ϕ es, por tanto, transducido por VGJ ϕ , en lo que constituye otra vía de transmisión horizontal de los genes de la toxina del cólera. Como consecuencia, los genes de la toxina pueden ser transmitidos vía HybP ϕ hacia poblaciones de *V. cholerae* que no expresen TCP. Asimismo, VGJ ϕ e HybP ϕ son capaces de integrarse al cromosoma bacteriano por el mismo sitio que lo hace CTX ϕ , lo cual garantiza que dicha transmisión pueda perpetuarse también verticalmente si las bacterias infectadas por el fago híbrido poseen este sitio de integración.²

El conocimiento de las vías de transmisión horizontal de los genes de la toxina del cólera y otros relacionados con la virulencia de *V. cholerae* ha sido de gran importancia en la comprensión de la evolución de las cepas virulentas del patógeno. Esto ha permitido a los investigadores tener una mayor visión de las posibles tendencias epidemiológicas que seguirá el cólera como enfermedad, y ha influido directamente en las estrategias que se siguen en la actualidad para diseñar vacunas vivas atenuadas genéticamente contra el cólera, en el sentido de que no readquieran genes relacionados con la virulencia por infección con uno de estos fagos.²

En este trabajo se realiza la caracterización preliminar de VEJ ϕ , un nuevo fago filamentoso de *V. cholerae* relacionado con el fago VGJ ϕ , y se explora su capacidad de transmisión horizontal de genes entre poblaciones de este patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, plasmidios, fagos y medios de cultivo

En este estudio se utilizaron diversas cepas bacterianas, plasmidios y fagos (Tabla 1). Los cultivos realizados crecieron en medio Luria-Bertani (LB): (triptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; cloruro de sodio, 10 g/L y agar 15 g/L para medio sólido) ajustado a pH 6,5 o a pH 7,0 (Oxoid, RU). Cuando fue necesario, se añadió 100 μ g/mL de kanamicina al medio.

Enzimas y reactivos

Las enzimas de modificación / restricción utilizadas en este trabajo fueron adquiridas de las firmas Promega (EE.UU.), Amersham (RU) y New England Biolabs (EE.UU.). Para su uso se tuvieron en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. Los reactivos empleados fueron adquiridos de las firmas Merck (Alemania), Sigma (EE.UU.) y Promega. Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 1) se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba).

Ensayos de infección

Cada ensayo de infección se realizó tomando una colonia fresca de la cepa receptora resuspendida en 30 μ L de LB, o alternativamente, 30 μ L de un cultivo fresco de la misma cepa. Dichas suspensiones celulares se infectaron con una preparación concentrada de fagos, y se incubaron durante 20 min. Posteriormente, las células infectadas se adicionaron a volúmenes mayores de medio de cultivo, y se cultivaron en las condiciones requeridas. Alternativamente, se realizaron ensayos de infección en los que la preparación de fagos era el sobrenadante de un cultivo infectado. Dichos sobrenadantes fueron filtrados (filtros Sartorius de 0,22 μ m) y chequeados para comprobar la ausencia de células por siembra en LB sólido de una alícuota de 50 μ L.

Titulación de VEJ ϕ

Para titular al fago VEJ ϕ se partió de un pequeño volumen de suspensión de células de la cepa 569B infectadas, como se describe en el

epígrafe anterior. Dicha suspensión se centrifugó a baja velocidad (5 000 g) por 10 min y se desechó el sobrenadante, para eliminar un posible exceso de fagos en el mismo. El precipitado de células fue resuspendido en medio LB y el cultivo resultante se dejó crecer por 6 horas, en las que se alcanzaron densidades ópticas entre 2 y 3 a 600 nm. Se eliminaron las células de 1 mL de este cultivo donador mediante centrifugación y filtración (filtros Sartorius de 0,22 μ m) del sobrenadante. Se sembró una alícuota de 50 μ L del filtrado en una placa de LB sólido, la cual se incubó a 37 °C toda la noche para comprobar la esterilidad por ausencia de colonias. Se usaron 100 μ L del sobrenadante libre de células, o diluciones del mismo, para infectar $\sim 10^8$ células de un cultivo fresco de la cepa usada como receptora (suspendidas en 20 μ L de LB), y esta mezcla de infección se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, la mezcla se añadió a un tubo de ensayo que contenía 3 mL de LB-agar suave (agar 0,4 %, Oxoid, RU) fundido a 42 °C, se homogeneizó y se vertió rápidamente sobre placas Petri de LB sólido. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y a continuación, se contaron las unidades formadoras de placas de pseudolisis (UFP). Cada titulación se realizó por replicado al menos tres veces.

Purificación de partículas virales a partir de cultivos infectados

Se tomaron 100 mL de un cultivo infectado crecido durante 14 h y se centrifugaron a 8 000 g durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m (Sartorius) para eliminar las células residuales. Al filtrado se le añadió polietilenglicol 6 000 al 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 PBS.

Purificación de ADN de la forma replicativa y el genoma viral

La forma replicativa (FR) y el ADNcs del genoma fago VEJ ϕ se purificaron como se describió por Campos y cols. en el 2003.⁶

Ensayo de transducción de CTX ϕ por VEJ ϕ

En este ensayo se utilizaron como cepas donadoras de fagos 569B/CTX-Kn ϕ , 569/VEJ ϕ y 569/CTX-Kn ϕ /VEJ ϕ ; y como cepas receptoras 569B,

Tabla 1. Relación de cepas, plasmidios y fagos utilizados en este trabajo.

Cepas/Plasmidios/ Fagos/Oligonucleótidos	Características/Secuencia	Origen / referencia
<i>E. coli</i>		
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac proAB)	Promega
<i>V. cholerae</i>		
569B	Tipo salvaje; serogrupo O1, biotipo clásico, serotipo Inaba	Calcuta, India, 1945
C6706	Tipo salvaje; serogrupo O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba	Perú, 1991
KHT46	C6706 ΔmshA1	Theelin y Taylor, 1996 ⁷
KHT52	C6706 ΔtcpA10	Theelin y Taylor, 1996 ⁷
MO45	Tipo salvaje; serogrupo O139	Madras, India, 1993
Plasmidios		
pIJ2921	Vector para clonación de uso general	Mendez y Chater, 1987 ⁸
p4	Derivado de pIJ2921 con un fragmento de 453 pb, proveniente de la FR de VEJφ, clonado en el sitio SmaI	Este estudio
p5	Derivado de pIJ2921 con un fragmento de 1039 pb, proveniente de la FR de VEJφ, clonado en el sitio SmaI	Este estudio
p11	Derivado de pIJ2921 con un fragmento de 1787 pb, proveniente de la FR de VEJφ, clonado en el sitio SmaI	Este estudio
Fagos		
CTX-Knφ	CTXφ con casete de Kn ^r de pUC4K insertado en el sitio único NotI	Campos y col., 2003 ²
VEJφ	Fago filamentososo de <i>V. cholerae</i>	Este estudio
Oligonucleótidos		
EJ-1	5' GGAAGAAGCAACGATTGTCG 3'	Este estudio
EJ-2	5' CCGTATTGAGCAAACCTTCTC 3'	Este estudio
EJ-3	5' CTATGAGCAAGAAAGCGAGG 3'	Este estudio
EJ-4	5' CTCGACTCAATTCTGACAAC 3'	Este estudio
EJ-5	5' CATTTCGCTTCGATTCATTG 3'	Este estudio
EJ-6	5' ACTCATAGAACCAATGGATG 3'	Este estudio
EJ-7	5' GCTTAGTTCGCTCTCGACTTG 3'	Este estudio
EJ-8	5' GTAATGGCTAACATCACTGG 3'	Este estudio
EJ-9	5' CATCGGTGATACCAGAGAAG 3'	Este estudio
EJ-10	5' GTGATCATCAATACTCTTGC 3'	Este estudio

KHT46 y KHT52. Las cepas donadoras fueron crecidas en LB hasta que los cultivos alcanzaron una $DO \approx 1$. A continuación, se centrifugaron a 1000 g durante 1 min para precipitar las células, y sus respectivos sobrenadantes de cultivo fueron filtrados y chequeados para ausencia de células como se describe en el epígrafe *Titulación de VEJφ*. De estos sobrenadantes se hicieron diluciones seriadas 1 : 10 hasta 10⁻³. Se tomaron 100 μL de cada una de estas diluciones, incluyendo los sobrenadantes puros, para infectar una suspensión de 20 μL de cada una de las cepas receptoras, como se describió anteriormente, y se plaquearon 25 μL

de cada mezcla de infección en LB sólido suplementado con kanamicina. Paralelamente, se sembraron 20 μL de cada cepa receptora en este mismo medio. Las placas se dejaron crecer a 37 °C toda la noche, y al día siguiente se contaron las colonias resistentes.

Secuenciación del genoma viral

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el sistema *Thermo Sequenase CyS Dye Terminator Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, RU) y las secuencias fueron obtenidas con un secuenciador de ADN *AL-Fexpress* (Amersham Pharmacia Biotech). Para obtener la secuencia

completa del genoma del fago VEJφ primeramente se clonaron varios fragmentos de la forma replicativa (FR) de este fago en el vector pIJ2921. Cada fragmento clonado se secuenció por ambas cadenas utilizando los oligonucleótidos universales directo y reverso. El resto de la secuencia se obtuvo secuenciando directamente el ADNc genómico o la FR del fago con los oligonucleótidos EJ-1 al 10 (Tabla 1). Cada secuencia obtenida suministró la información para diseñar y sintetizar un oligonucleótido utilizado en la secuenciación de la región contigua, y se fue recorriendo la secuencia hasta completar el genoma circular completo. Cada reacción

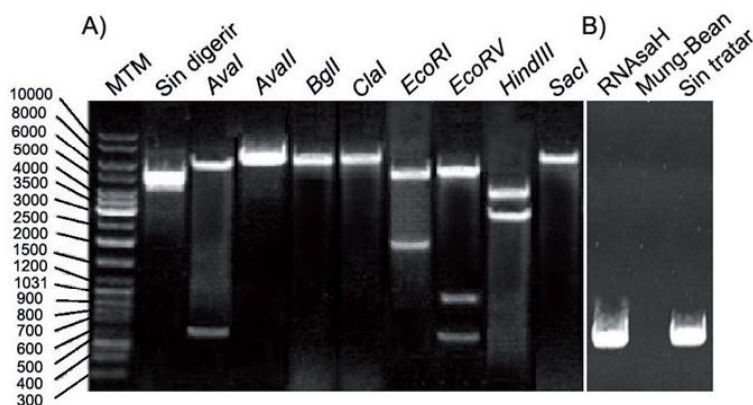


Fig. 1. A) Electroforesis en gel de agarosa de la forma replicativa del fago VEJ ϕ sin digerir, y digerido con distintas enzimas de restricción. MTM: marcadores de talla molecular (se indica la longitud de las bandas en bases). Obsérvese que la molécula linealizada se retarda respecto a la sin digerir, migrando con una talla aparente de alrededor de 7 kpb. B) Electroforesis en gel de agarosa del genoma de ADNcs de VEJ ϕ tratado con diferentes enzimas: a la izquierda, con ribonucleasa H; en el centro, con nucleasa Mung-Bean; a la derecha, sin tratar.

de secuencia se realizó al menos dos veces, y se asumió como secuencia confiable cuando ésta se repitió idéntica en cada reacción. Cuando la secuencia fue dudosa se realizaron nuevas reacciones de secuencia con el mismo oligonucleótido u otro diferente hasta obtener una misma secuencia coincidente al menos dos veces. Las secuencias obtenidas fueron empalmadas y analizadas usando el paquete de programas *Vector NTI 6000* (Informas, Inc). Para la comparación de secuencias, tanto de ADN como de proteínas, se utilizó el programa *AlignX* del paquete antes mencionado o el programa *BLAST*⁹ en línea desde el sitio web de la NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Purificación de ADN plasmídico

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*.

Electroforesis de ADN y purificación de bandas de geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 % (m/v) en disolución reguladora TAE (40 mM Tris-acetato, 20 mM EDTA) y a una intensidad de 4 V/cm. Se utilizó bromuro de etidio (1 μ g/mL) o naranja de acridina (1 μ g/mL) para visualizar el ADN mediante la incidencia de radiación UV en un transiluminador FBTIV-88 (Fisher Biotech, EE.UU.) La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el sistema *GFX™ PCR DNA and gel Band Purifica-*

tion (Amersham Pharmacia Biotech, RU), teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

Transformación de células de *Escherichia coli*

La transformación de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó mediante electroporación, tal como fue descrito por Dower y cols.¹⁰ a un voltaje de 2,5 kV en cubetas de 1 mm de separación entre los electrodos.

Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizaron según Laemmli,¹¹ utilizando geles con 15% de acrilamida en presencia de disolución reguladora tris-glicina. Los geles fueron revelados con azul de Coomassie.

Identificación de proteínas por secuenciación del extremo amino terminal

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y fueron electrotransferidas hacia membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), según fue descrito por Ausubel y cols.¹² Después de la transferencia, las membranas fueron teñidas con azul de Coomassie (0,1 % en metanol al 50 %) durante 5 min y desteñidas con metanol al 50 %, y se agitaron hasta que las bandas de proteínas fueron claramente visibles (5 a 10 min). Seguidamente, las membranas desteñidas fueron lavadas dos veces con agua destilada durante 5 min y la banda correspondiente a la proteína de interés fue recortada con un bisturí nuevo. La pieza de

membrana recortada fue utilizada para secuenciar el extremo amino terminal de la proteína mediante el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador automático *Applied Biosystem Procise* (Foster City, California, EE.UU.).

RESULTADOS

Identificación del nuevo fago filamentoso VEJ ϕ

La presencia de un fago fue detectada por infección de la cepa clásica 569B con sobrenadante de cultivo de la cepa MO45, del serogrupo O139, debido a la transmisión de un elemento extracromosomal de la cepa donadora a la receptora, sin que mediara contacto celular. En ninguno de los dos cultivos (donador y receptor) se observó lisis celular, sino una disminución de la velocidad de crecimiento del cultivo receptor respecto a un cultivo de 569B sin infectar crecido en las mismas condiciones. Por otra parte, se encontró que los sobrenadantes de cultivo de MO45 y 569B infectado eran capaces, después de varias diluciones, de producir placas opacas o de pseudolisis en un césped de la cepa receptora 569B. Estas observaciones sugirieron que el fago era producido por exportación continua desde la célula hospedera en vez de por lisis directa de la misma, lo cual apuntaba que se trataba de un fago filamentoso.¹ Por análisis con enzimas de restricción, se determinó que el elemento extracromosomal transmitido era una molécula de ADN doble cadena circular, por lo que se supuso que constituía la forma replicativa (FR) del virus (Fig. 1A). El tamaño estimado del episoma resultó ser de alrededor de 7 kb (Fig. 1A), lo cual es congruente con la suposición de que se estaba en presencia de un fago filamentoso, pues los genomas reportados de los mismos oscilan entre 5 y 10 kb.¹ Dicho análisis de restricción reveló además un patrón de bandas diferente al descrito para los demás fagos de *V. cholerae* secuenciados o con patrones de restricción conocidos (Fig. 1A), por lo que se llegó a la conclusión de se trataba de un nuevo fago filamentoso que se denominó VEJ ϕ .

Las partículas de VEJ ϕ fueron purificadas por precipitación con polietilenglicol y NaCl en frío a partir del sobrenadante de un cultivo de 569B infectado con el fago. A partir de estas se obtuvo el material genético viral, que fue resistente a la hidrólisis con varias enzimas de restricción y con ribonucleasa H

(Fig. 1B), pero fue degradado por la nucleasa de Mung-Bean (Fig. 1B), lo que indicó que el genoma viral estaba compuesto por ADNcs, ya que esta última enzima actúa específicamente sobre ese tipo de sustrato. Con un propósito confirmatorio, el ADN genómico fue aplicado en electroforesis en gel de agarosa paralelamente al episoma obtenido a partir del cultivo infectado de 569B y usando naranja de acridina como agente revelador. Al ser iluminado con luz UV, el genoma viral fluoresció naranja indicando que se trataba de ADNcs, mientras que el episoma o FR se vio mayoritariamente verde, como corresponde al ADNcd.¹³ La composición de genoma presente en VEJφ constituyó una nueva evidencia que indicaba que este podía ser un fago filamentosos.

Secuencia y estructura del genoma de VEJφ

La secuencia obtenida del genoma completo de VEJφ consta de 6 842 pb y presenta una composición de G+C de 42,95 %, ligeramente menor al porcentaje de G+C del genoma de *V. cholerae*: 47,7 % en el cromosoma I y 46,9 % en el cromosoma II. Utilizando el paquete de programas *Vector NTI Suite 7.0* (Infomax, Inc.), se llevó a cabo el análisis de la secuencia obtenida en busca de marcos de lectura abiertos u ORFs (del inglés *open reading frame*) que probablemente constituyeran genes funcionales, teniendo en cuenta la posición relativa de estos en el genoma, tamaño y (o) similitud de su producto proteico con genes descritos en otros fagos filamentosos conocidos, así como la presencia cuesta arriba de secuencias Shine-Dalgarno de unión a ribosomas. Siguiendo estas premisas, fueron seleccionados 11 ORFs, nueve de ellos codificados sobre la cadena positiva y dos sobre la negativa. Esto permitió confeccionar un mapa del genoma con los ORFs que con mayor probabilidad originan productos proteicos (Fig. 2).

La secuencia del genoma de VEJφ resulta muy similar a las de otros fagos secuenciados de *V. cholerae*. Los más cercanos en cuanto a porcentaje de identidad son VSK (93,1 %), VSKK (92,1 %), fs1 (89,9 %) y VGJφ (84,2 %) y comparten una organización genómica muy parecida. Este grado de relación de VEJφ con otros fagos filamentosos de *V. cholerae* descritos previamente corroboró que este era efectivamente un nuevo miembro de la familia de los fagos

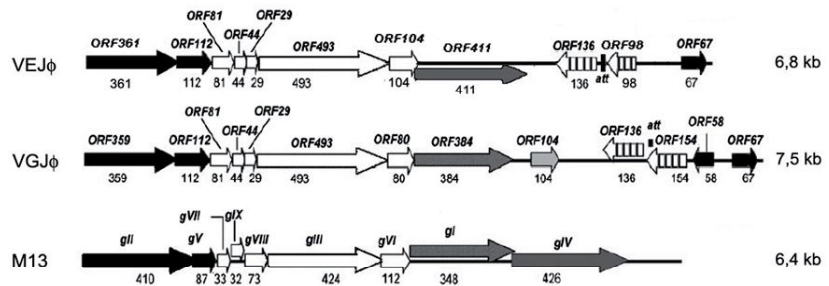


Fig. 2. Estructura modular del genoma de VEJφ comparada con las de los fagos VGJφ, de *V. cholerae*, y M13, de *E. coli*. Las flechas simbolizan a los ORFs/genes. El sentido de las flechas coincide con el de la transcripción. Debajo de cada ORF se destaca el número de aminoácidos de su producto proteico. En negro se colorean los módulos de replicación, en blanco los estructurales, y en gris oscuro los de ensamblaje y secreción. Los ORFs pertenecientes a bloques de regulación aparecen rellenos con barras verticales. En gris claro se colorea el ORF104 de VGJφ, de función desconocida. A la derecha de cada genoma se señalan sus respectivas tallas en kilobases.

filamentosos. Sin embargo, a pesar de las semejanzas, existen zonas del genoma altamente divergentes y ORFs no compartidos entre todos estos fagos, además de presentar un tamaño genómico diferente.

VEJφ presenta una organización modular semejante a la que poseen otros fagos filamentosos, como por ejemplo, los fagos M13 y VGJφ de *E. coli* y *V. cholerae*, respectivamente (Fig. 2). El péptido codificado por el ORF361 de VEJφ resultó ser altamente homólogo a la proteína de la replicación del fago VGJφ (pII^{VGJ}), y también mostró niveles menores de similitud con la proteína RStA de CTXφ. Además el ORF361 es semejante en posición y tamaño al gen II de M13 (Fig. 2), si bien no se encontraron similitudes notorias a nivel de secuencia. Las proteínas pII^{VGJ} y pII de M13 son esenciales para la replicación de sus respectivos fagos por el mecanismo del círculo rodante,¹ mientras que RStA, además, se precisa para llevar a cabo la replicación desde el cromosoma de CTXφ.¹⁴ El producto del ORF112, el siguiente en el orden, es idéntico a su homólogo en VGJφ, y muestra un alto nivel de similitud con un péptido del fago KSF-1. Todos se asemejan en tamaño y posición al producto del gen V de M13 (Fig.1) y por tanto se les asigna la función de proteínas de unión a ADNcs (*SSB*, del inglés *single stranded DNA binding protein*). En M13, pV constituye el puente entre la replicación del genoma y la morfogénesis de las partículas virales, pues secuestra al ADNcs para que sea reconocido por las proteínas de ensamblaje de la cápside y evita que se incorpore a la ruta replicativa.¹ Se puede asumir, por tanto, que el ORF361 y el ORF112 son funcionalmente homólogos a los genes II y V

de M13, y que constituyen el módulo de replicación hipotético de VEJφ.

Los productos de los ORFs 81, 44, 29, 493 y 104 presentan elevados niveles de homología con proteínas hipotéticas o comprobadas de las cápsides de otros fagos de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, por lo que parecen constituir el módulo estructural de VEJφ (Fig. 2). En particular, el producto del ORF44 es casi idéntico a la proteína mayoritaria de la cápside de VGJφ, pVIII^{VGJ}, mientras que el codificado por el ORF493 presenta un 98 % de similitud con la proteína de adsorción del mismo fago, pIII^{VGJ}, por lo que es muy probable que estos dos ORFs constituyan genes funcionales que codifiquen estas mismas funciones en VEJφ. El producto del ORF104 muestra niveles de homología del 76 % y 99 % respectivamente, con supuestas proteínas estructurales minoritarias de los fagos filamentosos VGJφ y VSK. La identidad funcional de estas proteínas no está demostrada, aunque se asume que deban tener un rol homólogo al de pVI en M13 debido a similitudes en tamaño y posición de sus genes respectivos. Los productos del ORF29 y el ORF81 en VEJφ presentan niveles de identidad del 100 % y el 99,8 % respectivamente, con los productos de los ORFs homónimos en VGJφ, por lo que se puede casi asegurar que cumplen la misma función en los dos fagos. Estos ORFs deben codificar proteínas análogas a pVII y pIX en M13, aunque no resulta evidente decir a cuál le corresponde cada función debido a que las relaciones de similitud en tamaño y posición no son en este caso muy claras.

El producto del ORF411 exhibió niveles de similitud del 28 % con la proteína de ensamblaje del fago

ϕ LF de *Xantomonas campestris* y del 26,7% con la proteína Zot que cumple la misma función en CTX ϕ . Los niveles de homología más elevados, sin embargo, resultaron de la comparación con supuestas proteínas de ensamblaje de los fagos VGJ ϕ y VSK de *V. cholerae*. El ORF411 es también semejante en tamaño y posición al gen I de M13 (Fig. 2). Este gen codifica a la proteína de ensamblaje pI, la cual se inserta en la membrana citoplasmática del hospedero y reconoce al sitio de empaquetamiento en el ADNcs de este fago durante su morfogénesis. El ORF411 parece, por tanto, constituir el módulo de ensamblaje de VEJ ϕ .

Más adelante, aparecen en la secuencia de VEJ ϕ el ORF136 y el ORF98 (Fig. 2), los cuales se encuentran codificados sobre la cadena complementaria y por tanto, aparecen representados en sentido contrario al resto de los ORFs ya mencionados. Los mismos son muy similares en secuencia, tamaño, posición y orientación a los ORFs 136 y 154 del fago VGJ ϕ que componen su supuesto módulo regulatorio. El producto del ORF136 de VEJ ϕ fue similar al represor hipotético homónimo de VGJ ϕ (99,3 %) y al represor 1 de VSK (47,1 %). El producto del ORF98 resultó homólogo al represor 2 del fago VSK (46,1 %) y a un represor de la familia lacl en *Thermotoga maritima* (35,1 %), mientras que fue casi idéntico a la región amino terminal del supuesto represor producto del ORF154 de VGJ ϕ . Estos resultados indican que probablemente estos dos ORFs constituyen el módulo de regulación de VEJ ϕ .

Por último, el péptido codificado por el ORF67 aparece conservado en los fagos VGJ ϕ y fs1, en los que su función es desconocida debido a que no presenta homología significativa con ninguna otra proteína reportada, ni se asemeja en tamaño o posición a ningún otro producto de gen/ORF con función conocida en algún otro fago filamentosos. No obstante, en VGJ ϕ se le asigna una posible función dentro de la replicación por su ubicación en el genoma,⁶ por lo que en VEJ ϕ también se incluyó tentativamente en este módulo.

Titulación de VEJ ϕ

La producción de VEJ ϕ por cultivos líquidos infectados de la cepa clásica 569B fue evaluada por titulación de las partículas virales exportadas al sobrenadante mediante conteo de placas opacas (de pseudolisis)

sobre cultivos en medio semisólido de la cepa receptora 569B, como se indica en *Materiales y métodos*. Se obtuvieron títulos promedio de $7,4 \times 10^{10}$ partículas/(unidades de DO x mL), por lo que se puede calificar a VEJ ϕ como un fago muy prolífico.

La proteína mayoritaria de la cápside

En los fagos filamentosos, la proteína mayoritaria de la cápside se encuentra a razón de más de 2 000 copias por partícula viral, mucho mayor que las demás proteínas estructurales, de las que se ensamblan sólo 3 a 5 copias por virión.¹ De ahí que sea esta la única proteína que se aprecie significativamente en SDS-PAGE de fagos completos teñida con azul de Coomassie. En el caso de VEJ ϕ , se observó una proteína de alrededor de 4 kDa cuando las partículas virales purificadas fueron sometidas a este tratamiento (Fig. 3). Dicha proteína fue secuenciada en su extremo amino terminal por el método de degradación automática de Edman. La secuencia obtenida de 10 aminoácidos coincidió exactamente con la predicha para el producto del ORF44, que por análisis de la secuencia del genoma del fago había sido identificado como posible proteína estructural mayoritaria.

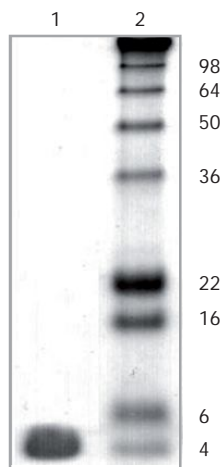


Fig. 3. Proteína mayoritaria de la cápside de VEJ ϕ visualizada por SDS-PAGE. 1: Partículas virales de VEJ ϕ purificadas, donde se observa la banda correspondiente a la proteína mayoritaria de la cápside. 2: Patrón de peso molecular con los valores de cada banda a la derecha, en kDa.

La fimbria MSHA es el receptor de VEJ ϕ

Los fagos de *V. cholerae* reportados hasta el momento para los que se conocen sus receptores utilizan con este fin las fimbrias de tipo IV TCP y MSHA, por lo que es muy probable

que VEJ ϕ no sea la excepción. Con el objetivo de determinar cuál de las dos es el receptor de este fago, se utilizaron sobrenadantes de cultivo (libres de células) de la cepa 569B infectada con VEJ ϕ para infectar a los mutantes isogénicos KHT46 y KHT52 y a la cepa parental de ambos, C6706. Estos mutantes son incapaces de expresar las fimbrias MSHA y TCP respectivamente, por delección de los genes de las pilinas correspondientes. Como resultado, tanto en la cepa mutante KHT52 como en la salvaje C6706 se constató la transducción del episoma correspondiente a la forma replicativa de VEJ ϕ , lo cual fue comprobado por análisis de restricción. KHT46, sin embargo, no fue sensible a la infección, a juzgar por la ausencia de transmisión de dicho episoma. Estas evidencias indican que la fimbria MSHA es la receptora del fago VEJ ϕ , pues es la que se expresa en las dos cepas sensibles a la infección.

El posible sitio de integración de VEJ ϕ

Hasta el momento, se han reportado varios fagos de *V. cholerae* que poseen la capacidad de integrarse al genoma del hospedero. En el caso de CTX ϕ , la integración es catalizada por las recombinasas XerCD, que usan como sustrato el ADNcs de este fago para insertarlo en el sitio cromosomal *dif1* mediante un novedoso mecanismo de integración.^{15,16} También VGJ ϕ es capaz de integrarse al sitio *dif1*, y de cointegrarse al *attRS1* en RS1 y CTX ϕ , muy probablemente usando estas recombinasas, aunque nada se ha dicho acerca del sustrato viral en este caso.^{2,6} A la luz de estos conocimientos, se procedió a identificar posibles sitios de catálisis de las recombinasas XerCD en el genoma de VEJ ϕ , y algunos fagos integrativos relacionados para los que no se han descrito sitios de este tipo. Al tomar como molde para la búsqueda el sitio *dif1* del cromosoma de *V. cholerae*, se encontraron sitios candidatos en las cadenas negativas de los fagos VEJ ϕ , VGJ ϕ , VSK y VSKK, que resultaron ser casi idénticos entre sí, pues solo diferían en pocas bases de *dif1* (Fig. 4). En el resto de los genomas de estos fagos no fueron encontrados otros sitios que mostraran similitud de secuencia con los sitios de unión a XerC y XerD, y que a la vez estuvieran cercanos entre sí. Los supuestos sitios de unión a XerC mostrados arriba difieren en dos bases de once respecto a su homólogo en *dif1*, excepto el encontrado en VSKK, que

Tabla 2. Evaluación de la transducción de CTX ϕ hacia diferentes cepas mediada por VEJ ϕ .

Cepas donoras*	Cepas receptoras**		
	KHT46	KHT52	569B
569B/CTX-Kn ϕ	-	-	4,1 · 10 ⁶
569B/CTX-Kn ϕ /VEJ ϕ	-	5,5 · 10 ⁴	4,1 · 10 ⁵
569B/VEJ ϕ	-	-	-

*Cultivos cuyos sobrenadantes libres de células se utilizaron en el ensayo de infección. **Cepas receptoras, crecidas en condiciones de expresión de TCP. En las casillas interiores se relaciona el número de transductantes Kn^r promedio observado en cada ensayo de infección. Con un guión se señalan los ensayos en que estos no se detectaron.

difiere en tres bases; mientras que los sitios propuestos de unión a XerD son idénticos en todos los fagos y difieren en dos bases de once comparados con el sitio correspondiente en *dif1*. Las regiones centrales constan de siete nucleótidos en lugar de seis en *dif1*, y son idénticas a la de este en 5', donde todas portan el triplete TGT. Los extremos 3' de dichas regiones centrales, sin embargo, difieren significativamente de su contraparte en *dif1*. En particular el conjunto de los sitios de unión a las recombinasas con las regiones centrales es el mismo en VGJ ϕ y VEJ ϕ , por lo que es muy probable que este último fago también sea capaz de integrarse al genoma hospedero utilizando el sistema XerCD, aunque esto no ha sido comprobado experimentalmente.

VEJ ϕ transduce a CTX ϕ

El hallazgo de sitios de unión a las recombinasas XerCD en VEJ ϕ idénticos a los de VGJ ϕ y muy similares al sitio *dif1* del cromosoma I de *V. cholerae*, sugirió fuertemente la idea de que VEJ ϕ al igual que VGJ ϕ también podía transducir al fago CTX ϕ y con este a los genes de la toxina del cólera mediante la cointegración de sus genomas.² Para demostrar si VEJ ϕ era capaz de transducir a CTX ϕ se utilizó una variante marcada de CTX ϕ con un gen de resistencia a kanamicina (CTX-Kn ϕ), de manera que se pudiera seguir la transducción mediante la transmisión del fenotipo resistente a este antibiótico. La cepa 569B fue infectada con CTX-Kn ϕ o VEJ ϕ , o coinfectada con ambos, y se realizaron ensayos de infección por triplicado con los sobrenadantes de los tres cultivos utilizando como cepas receptoras a los mutantes isogénicos KHT46 y KHT52, y la propia cepa 569B (Tabla 2). Como se esperaba, 569B infectada con CTX-Kn ϕ transmitió la resis-

tencia al antibiótico a la cepa 569B que expresa TCP en las condiciones del experimento, pero no a KHT52, mutante defectivo de esta fimbria. A pesar de expresar TCP, la cepa KHT46 tampoco adquirió fenotipo resistente debido a que posee profagos El Tor integrados en el genoma que impiden, por pertenecer al mismo grupo de inmunidad, la replicación del genoma de CTX-Kn ϕ y por tanto la expresión del gen Kn^r.¹⁷ Sin embargo, la cepa 569B coinfectada con CTX ϕ y VEJ ϕ fue capaz de transmitir la resistencia a kanamicina tanto hacia la cepa 569B como hacia KHT52, que no expresa TCP (Tabla 2), por lo que la transmisión tuvo que haberse producido vía infección por MSHA con un fago que portara el genoma de CTX-Kn ϕ .

Como era lógico de esperar, los cultivos de 569B infectados con VEJ ϕ fueron incapaces de transmitir la resistencia a kanamicina hacia ninguna de las cepas usadas como receptoras (Tabla 2). Se comprobó, como controles del experimento, la ausencia de resistencia a este antibiótico por las cepas receptoras, así como que los sobrenadantes de infección de cada cepa donora estuvieran libres de células.

DISCUSION

Hasta el momento de realización de este trabajo, habían sido descritos ocho bacteriófagos filamentosos capaces de infectar a *V. cholerae*: CTX ϕ , fs1, fs2, VSK, VSKK, 493, VGJ ϕ y KSF-1.^{3,6,18,19,20,21,22} De estos, varios han sido relacionados con mecanismos de transferencia horizontal de genes entre las cepas de *V. cholerae* hospederas, cuyo conocimiento ha marcado profundamente la óptica de estudio de este patógeno en cuestiones como adaptación a diferentes ambientes, evolución y coevolución con estos fagos, así como en problemas prácticos como el diseño de

vacunas seguras y efectivas contra *V. cholerae* u otras estrategias terapéuticas.^{2,3,22} El descubrimiento de que el elemento *ctx* constituía en realidad el genoma integrado del fago filamentososo CTX ϕ constituyó el primer gran hito en este sentido, pues implicaba la existencia de un mecanismo de transferencia horizontal de los genes de la toxina del cólera, principal factor de virulencia de *V. cholerae*.³ El segundo fue el hallazgo de un mecanismo de transmisión alternativo de estos genes por el fago VGJ ϕ , mediante el cual los mismos podían ser adquiridos por cepas del patógeno no sensibles a la infección con CTX ϕ .² La isla patogénica VPI, en la que se agrupan los genes requeridos para la expresión del pilus TCP, receptor de CTX ϕ , parece ser también un elemento móvil, aunque su mecanismo de transmisión es aún discutido.⁵ Más recientemente, ha sido postulado incluso que los genes de la toxina del cólera fueron a su vez adquiridos por un precursor ancestral de CTX ϕ , posiblemente por escisión imprecisa del genoma de un hospedero también ancestral y hasta hoy desconocido.²³

En este trabajo se caracteriza a VEJ ϕ , un nuevo fago filamentososo capaz de transmitir los genes de la toxina del cólera, el cual está estrechamente relacionado con otros fagos filamentosos como VSK, VSKK, VGJ ϕ y fs1. A nivel de secuencia nucleotídica VEJ ϕ exhibe altos niveles de similitud con estos fagos, lo cual indica una estrecha cercanía evolutiva. El genoma de VEJ ϕ posee una estructura modular similar a la estructura genómica general de los fagos filamentosos pertenecientes al género inovirus (Fig. 2).

Dentro del módulo estructural de VEJ ϕ , que codifica las proteínas de la cápsida, se identificó el gen que codifica la proteína mayoritaria de la cápsida mediante secuenciación del extremo amino terminal de ésta. El gen se correspondió con el ORF44 del fago. Por tanto, se decidió renombrar este ORF como *gVIII*^{VGJ ϕ} y su producto proteico como *pVIII*^{VGJ ϕ} , para seguir la denominación usual en los fagos filamentosos. Un aspecto interesante de esta proteína es que no tiene péptido señal para su inserción en la membrana citoplasmática como la mayoría de los fagos filamentosos previamente descritos. Sin embargo, se conoce que en algunos fagos filamentosos como Pf3 y C2, la proteína mayoritaria de la cápsida no posee péptido señal y no obstante, se inserta en la

membrana antes del ensamblaje del fago.¹ Lo mismo debe suceder con la proteína mayoritaria de VGJφ.

VEJφ es un fago muy prolífico. Los títulos generados en cultivos infectados de 569B son de cerca de 10¹¹ partículas / (ml x unidad de DO), muy similares a los de VGJφ y M13, y muy superiores a los de CTXφ.^{1,3,6} Considerando que los cultivos de *V. cholerae* en estas condiciones crecen con densidades celulares de aproximadamente 8 x 10⁸ células / (unidades de DO x ml), se calcula que cada célula produce entonces 92 partículas virales como promedio en el tiempo de cultivo ensayado (6 h). Este valor es mucho mayor al reportado para CTXφ (mucho menos de una partícula por célula) y semejante al calculado para VGJφ que es de 125 partículas por célula.⁶

Durante el proceso de infección VEJφ utiliza como receptor a la fimbria MSHA, al igual que el resto de los vibriofagos filamentosos descritos con la excepción de CTXφ. Este era un resultado esperado considerando la extensa homología de secuencia del genoma de VEJφ con el de otros fagos de *V. cholerae* que utilizan el mismo receptor (VGJφ, VSK, VSKK), y en particular, la casi identidad del producto del ORF493 con la proteína de unión de VGJφ a esta misma fimbria, pIII^{VGJφ}. Este resultado confirma el hecho, discutido por otros autores, de que MSHA es una fimbria mucho más accesible a la función de recepción de fagos que TCP, pues se expresa en una mayor variedad de condiciones ambientales, dentro y fuera del intestino humano.^{2,24}

Dentro de las secuencias nucleotídicas de VEJφ y de los fagos integrativos VGJφ, VSK y VSKK se encontraron sitios de reconocimiento por las recombinasas XerCD, ubicados en todos los casos sobre la cadena negativa (Fig. 4). Las recombinasas, cuya función primaria es resolver los dímeros de cromosomas generados

durante la replicación bacteriana, catalizan además la integración de CTXφ y muy probablemente de VGJφ en el cromosoma bacteriano.^{2,15,16} Cada uno de los sitios de reconocimiento identificados en aquellos fagos es muy similar a *dif1* (9 bases de 11 a excepción del sitio de unión a XerC en VSK), y se encuentran a una distancia de 7 pb uno del otro, a diferencia de la separación de 6 pb encontrada en *dif1*. Esta topología parece satisfacer los requerimientos de unión de las recombinasas al ADN y de interacción entre sí requeridas para la catálisis.¹⁵ En el resto de las secuencias de estos fagos no se encontraron parejas de sitios similares a las mostradas en la Fig. 4. Al considerar esto junto a las evidencias presentadas por Campos y col., que describen la integración de VGJφ y su cointegración con CTXφ y RST1, parece evidente que todos estos fagos se integran al cromosoma hospedero utilizando a XerC y XerD.^{2,6} El evento debe ocurrir por recombinación directa de las FRs y no mediante mecanismos análogos al de integración de CTXφ, ya que no se encontraron otras parejas de sitios de unión a estas enzimas, cercanos entre sí, que pudieran generar estructuras secundarias semejantes a *dif1* en los genomas de ADNcs de estos fagos. Este mismo análisis nos lleva a la suposición de que, al igual que VGJφ, los fagos VEJφ, VSK y VSKK son capaces de recombinarse con el ADNcs de CTXφ formando fagos híbridos que transportan los genes de la toxina del cólera entre poblaciones bacterianas por infección vía MSHA. En este trabajo se obtuvieron resultados que apoyan esta hipótesis para el caso de VEJφ.

Este fago fue capaz de transducir a CTXφ y por tanto a los genes de la toxina del cólera entre cepas del hospedero, lo cual fue demostrado mediante la transferencia de resistencia a kanamicina desde un cultivo de 569B coinfectado con VEJφ

y CTX-Knφ hacia la cepa KHT52 que expresa MSHA pero no TCP. La transducción no pudo producirse por el simple empaquetamiento del genoma de CTX-Knφ en la cápside de VEJφ, ya que KHT52 contiene profagos CTXφ^{El Tor} integrados que expresan el represor transcripcional RstR, y por tanto es resistente a la reinfección con esta variante del fago.¹⁷ La vía de transmisión debió ser, por tanto, la recombinación entre la FR de VEJφ y el ADNcs de CTXφ para dar lugar a un fago híbrido similar al formado entre VGJφ y CTXφ, que utilizo como receptor la fimbria MSHA.

La transducción de CTXφ por VEJφ constituye un nuevo ejemplo de transferencia genética horizontal mediada por fagos en *V. cholerae*, en particular de transmisión de los genes de la toxina colérica, principal factor de virulencia de este patógeno. Este mecanismo de transmisión fue descrito anteriormente para el fago VGJφ, y como ha sido discutido tanto en este trabajo como por otros autores, otros fagos como VSK y VSKK pudieran participar en estrategias de transmisión similares. En consecuencia, los ejemplos de transferencia horizontal de genes en *V. cholerae* pudieran ser más abundantes de lo que hoy se conoce, y su estudio será vital para el desarrollo de vacunas seguras contra este patógeno.

CONCLUSIONES

VEJφ es un nuevo fago filamentosos de *V. cholerae* que utiliza la fimbria MSHA como receptor, y su estructura genómica está organizada en módulos funcionales de modo similar a otros fagos filamentosos descritos anteriormente. Desde el punto de vista evolutivo, VEJφ está más relacionado con fs1, VGJφ y VSK, que con los demás fagos de *V. cholerae* cuyas estructuras genómicas han sido descritas. Al igual que el fago VGJφ, VEJφ es capaz de transducir a CTXφ y por tanto, a los genes de la toxina del cólera. Este último aspecto es de gran interés para el estudio de los mecanismos de transmisión horizontal relacionados con la evolución de bacterias patógenas que operan en la naturaleza.

BIBLIOGRAFIA

1. Marvin D.A. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 150-158, 1998.
2. Campos J., Martínez E., Marrero K., Silva Y., Rodríguez B.L., Suzarte E., et al. Novel type of specialized trans-

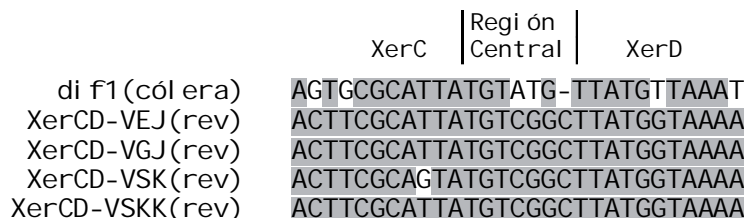


Fig. 4. Comparación, por alineamiento de secuencias, del sitio *dif1* de *V. cholerae* con sitios análogos codificados en las cadenas negativas de VEJφ, VGJφ, VSK y VSKK. Sobre fondo gris se destacan las bases consenso para cada posición. También se muestran los sitios probables donde se unen las recombinasas XerC y XerD separados por la región central.

- duction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 7231-7240, 2003.
3. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lyso-genic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1914, 1996.
 4. Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B. and Reeves P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**, 3134-3139, 1998.
 5. Rajanna C., Wang J., Zhang D., Xu Z., Ali A., Hou Y.M., et al. The vibrio pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholerae* forms precise extrachromosomal circular excision products. **J. Bacteriol.**, **185**, 6893-6901, 2003.
 6. Campos J., Martinez E., Suzarte E., Rodriguez 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 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. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685, 1970.
 12. Ausubel F., Brent M.R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., et al. Short protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc, New York, 1995.
 13. Carmichael G.G. and McMaster G.K. The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. **Methods Enzymol.**, **65**, 380-391, 1980.
 14. Waldor M.K., Rubin E.J., Pearson G.D., Kimsey H. and Mekalanos J.J. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2. **Mol. Microbiol.**, **24**, 917-926, 1997.
 15. Val M.E., Bouvier M., Campos J., Sherratt D., Cornet F., Mazel D., et al. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. **Mol. Cell**, **19**, 559-566, 2005.
 16. Huber K.E. and Waldor M.K. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. **Nature**, **417**, 656-659, 2002.
 17. Kimsey H.H. and Waldor M.K. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **95**, 7035-7039, 1998.
 18. Nakasone N., Honma Y., Toma C., Yamashiro T. and Iwanaga M. Filamentous phage fs1 of *Vibrio cholerae* O139. **Microbiol. Immunol.**, **42**, 237-239, 1998.
 19. Ikema M. and Honma Y. A novel filamentous phage, fs-2, of *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **144** (Pt 7), 1901-1906, 1998.
 20. Kar S., Ghosh R.K., Ghosh A.N. and Ghosh A. Integration of the DNA of a novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* O139 into the host chromosomal DNA. **FEMS Microbiol. Lett.**, **145**, 17-22, 1996.
 21. Jouravleva E.A., McDonald G.A., Garon C.F., Boesman-Finkelstein M. and Finkelstein R.A. Characterization and possible functions of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **144** (Pt 2), 315-324, 1998.
 22. Faruque S.M., Bin N., I, Fujihara K., Diraphat P., Chowdhury N., Kamruzaman M., et al. Genomic sequence and receptor for the *Vibrio cholerae* phage KSF-1phi: evolutionary divergence among filamentous vibriophages mediating lateral gene transfer. **J. Bacteriol.**, **187**, 4095-4103, 2005.
 23. Boyd E.F., Heilpern A.J. and Waldor M.K. Molecular analyses of a putative CTXphi precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX(phi)s by toxigenic *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **182**, 5530-5538, 2000.
 24. Ehara M., Shimodori S., Kojima F., Ichinose Y., Hirayama T., Albert M.J., et al. Characterization of filamentous phages of *Vibrio cholerae* O139 and O1. **FEMS Microbiol. Lett.**, **154**, 293-301, 1997.