

Secuencia nucleotídica completa del plasmidio suicida pSS1129

Complete nucleotide sequence of the suicide plasmid pSS1129

Lourdes L. Proenza Alfonzo^a, Karen Marrero, Rafael Fando Calzada^a

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

Recibido: 17/04/2019; Aceptado: 24/06/2019.

RESUMEN

La transferencia *in vitro* de material genético hacia *Bordetella pertussis*, agente etiológico de la tos ferina, se realiza mediante conjugación bacteriana desde cepas de *Escherichia coli*. El plasmidio suicida pSS1129 ha sido ampliamente utilizado para construir mutantes de *B. pertussis*. Este plasmidio además de poseer un origen replicativo de *E. coli*, tiene otro de transferencia, que permite su movilización desde una cepa conjugativa de *E. coli* hacia *B. pertussis* donde no puede replicarse y solo se conserva por integración en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Adicionalmente, contiene marcadores que confieren resistencia a ampicilina y gentamicina, así como sensibilidad a estreptomycin, útiles para determinar el sitio de la integración bacteriana e intercambio de material genético. La secuencia nucleotídica de este plasmidio es desconocida. El presente estudio tuvo como objetivos establecer la secuencia nucleotídica del pSS1129, así como anotar los principales determinantes genéticos codificados en ella. El empalme de las secuencias obtenidas en Macrogen, Korea, generó una secuencia total de 9690 pb. Mediante búsqueda de homología en bases de datos internacionales, fueron identificados los genes *bla*, *traJ*, *aacC1*, *rpsL* y *gcuP*, el origen *ColE1* de replicación y el origen de transferencia del plasmidio RK2, así como el sitio *cos* del fago lambda. También se localizaron varios sitios únicos de restricción útiles para la clonación de genes en este plasmidio. La secuencia nucleotídica del plasmidio pSS1129 determinada en este trabajo, facilitará su empleo en el diseño y obtención de nuevas generaciones de mutantes de *B. pertussis* con fines vacunales.

Palabras clave: Secuencia nucleotídica, plasmidio suicida, pSS1129

ABSTRACT

The *in vitro* transfer of genetic material to *Bordetella pertussis*, the etiological agent of whooping cough, is carried out by bacterial conjugation from *Escherichia coli* strains. The suicidal plasmid pSS1129 has been widely used to construct mutants of *B. pertussis*. This plasmid, in addition to having a replicative origin of *E. coli*, has another of transfer, which allows its mobilization from a conjugative strain of *E. coli* to *B. pertussis* where it cannot replicate and is only conserved by integration into the chromosome by homologous recombination. Additionally, it contains markers that confer resistance to ampicillin and gentamicin, as well as sensitivity to streptomycin, useful for determining the site of bacterial integration and exchange of genetic material. The nucleotide sequence of this plasmid is unknown. The objective of this study was to establish the nucleotide sequence of pSS1129, as well as to annotate the main genetic determinants encoded in it. The assembly of the resulting sequences from Macrogen, Korea, generated a total sequence of 9690 bp. By means of homology search in international databases, *bla*, *traJ*, *aacC*, *rpsL* and *gcuP* genes,

replication ColE1 origin and RK2 plasmid transfer origin, as well as, the cos site of lambda phage were identified. Several unique restriction sites useful for cloning genes in this plasmid were also located. The nucleotide sequence of plasmid pSS1129 determined in this work, will facilitate its use in the design and obtaining new generations of mutants of *B. pertussis* for vaccine purposes.

Keywords: Complete nucleotide, suicide plasmid, pSS1129.

INTRODUCCIÓN

Los plasmidios son elementos extracromosómicos de tamaño finito, generalmente heredados de manera estable dentro de una línea celular bacteriana y potencialmente capaces de transferirse entre cepas, especies o géneros.¹ Además, constituyen importantes herramientas genéticas utilizadas para manipular y analizar microorganismos mediante la introducción, modificación o eliminación de genes diana.² El proceso específico más vinculado a la adquisición de plasmidios es la conjugación,³ que constituye uno de los mecanismos más efectivos para diseminar elementos genéticos entre las bacterias, facilitando su rápida evolución y su capacidad de adaptación.² Los plasmidios conjugativos se transmiten tanto verticalmente (mediante la segregación a células hijas) como horizontalmente (a través de la transferencia a otra célula receptora).

La conjugación de plasmidios desde *Escherichia coli*, constituye la herramienta más utilizada para transformar *Bordetella pertussis*, microorganismo responsable de la tos ferina.⁴ Con este fin se han utilizado dos clases de plasmidios movilizables: los plasmidios de amplio rango de hospedero,⁵ que se replican en *B. pertussis* y los llamados plasmidios suicidas, que requieren integrarse al cromosoma de la bacteria receptora para su replicación. Estos últimos frecuentemente se utilizan para remplazamiento alélico. El uso de plasmidios suicidas portando genes mutados ha contribuido enormemente a la identificación y caracterización de genes específicos de virulencia.

El pRTP1 (del inglés, Return To Pertussis) es el plasmidio conjugativo más empleado para transformar *Bordetella*, cuya secuencia fue previamente descrita por Stibitz y cols., 1986.⁶ Este plasmidio se integra en el cromosoma mediante recombinación homóloga y posteriormente se escinde mediante un segundo evento de recombinación. El plasmidio pSS1129,⁷ es un derivado de pRTP1 que porta un gen que confiere resistencia a gentamicina. Dicho plasmidio ha sido ampliamente utilizado para crear mutantes de *B. pertussis*.^{8, 9} Además, pSS1129 contiene un oriT, para la transferencia conjugativa, que proviene del plasmidio de amplio rango de hospederos RK2;¹⁰ un origen de replicación vegetativo de ColE1, un gen que confiere resistencia a ampicilina, y el gen rpsL que codifica para la proteína ribosomal S12 de *E. coli*, que confiere sensibilidad a estreptomycin. Los plasmidios pRTP1 y pSS1129, al contener el origen de replicación ColE1, son incapaces de replicarse en *B. pertussis* y así si la cepa receptora está sometida a la acción del antibiótico para el cual el plasmidio porta los genes de resistencia, solo la bacteria que presenta el plasmidio integrado en el cromosoma será capaz de multiplicarse. En aquellas células en las que ocurren un doble evento de recombinación homóloga, se sustituye el gen de interés por el gen modificado que porta el plasmidio, así como el gen rpsL y todos los marcadores genéticos del plasmidio. Hasta el momento no se ha descrito la secuencia nucleotídica íntegra del plasmidio pSS1129, lo que resulta una información importante durante su empleo para manipular genéticamente a *B. pertussis*. El presente estudio tuvo como objetivos establecer la secuencia nucleotídica

del pSS1129, así como anotar los principales determinantes genéticos codificados en la secuencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, plasmidios y medios de cultivo

En este estudio se utilizó la cepa de *E. coli* Mach1 (Δ recA1398 endA1 tonA Φ 80 Δ lacM15 Δ lacX74 hsdR rK- mK+, Invitrogen, 2004), transformada con el plasmidio pSS1129. Dicho plasmidio fue donado gentilmente por el Dr. Frits Mooi, del Instituto Nacional para la Salud Pública y el Medioambiente (RIVM), Bilthoven, Holanda. Para el crecimiento de la cepa Mach1/pSS1129 se utilizó el medio Luria Bertani (LB, triptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; cloruro de sodio, 10 g/L; pH 7,0; suplementado con agar, 1,5 g/L en el caso de medio sólido), suplementado con ampicilina a 100 μ g/mL y gentamicina a 10 μ g/mL, a 37 °C, durante toda la noche. Los componentes del medio se adquirieron de Oxoid, Reino Unido.

Técnicas usadas en el trabajo con ADN

Para el aislamiento del ADN plasmídico se utilizó el sistema Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega, EE. UU.). Las reacciones enzimáticas de modificación-restricción de ADN se realizaron teniendo en cuenta las recomendaciones del proveedor (Promega) y las enzimas fueron adquiridas de Promega (EE.UU.). La separación de bandas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Merck, EE.UU.) al 0,8 % (m/v) en disolución reguladora TAE (40 mmol/L tris-acetato, 20 mmol/L EDTA, cuyos componentes fueron adquiridos en Merck, EE.UU.) y a una intensidad de 4 V/cm.

Obtención y anotación de la secuencia nucleotídica del plasmidio pSS1129

Para establecer la secuencia nucleotídica del plasmidio se solaparon 18 fragmentos de ADN de aproximadamente 900 pb, obtenidos mediante secuenciación de manera independiente en Macrogen (Corea del Sur). Las regiones de los fragmentos secuenciados con un coeficiente de calidad superior a 20 se empalmaron manualmente y el programa BLASTN¹¹ con sus parámetros por defecto, se utilizó para buscar secuencias nucleotídicas similares depositadas en la base de datos GenBank de NIH (por sus siglas en inglés, National Institutes of Health), de Estados Unidos. Para la predicción de los sitios y genes codificados, así como las anotaciones se realizaron alineamientos de regiones homólogas utilizando el programa BLAST en línea. Para realizar los alineamientos de secuencias y determinar los sitios de restricción útiles para clonación de fragmentos, se utilizó el programa Alignment del paquete de programas Vector NTI suite 7, con sus parámetros por defecto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mapa genético del plasmidio pSS1129

El análisis de las secuencias obtenidas como resultado de la secuenciación nucleotídica, que fueron empalmadas y analizadas, reveló que el plasmidio pSS1129 contiene 9690 pb (Fig. 1). La búsqueda de alineamientos BLASTN contra la base de GenBank consultada en abril de 2019, reveló que en el plasmidio pSS1129 se encontró una región de 5633 pb, comprendida entre nucleótido 9160 y el 5102 del pSS1129, 100% idéntica a la del plasmidio de *E. coli* LIC-

pDEST-LC2 (con número de acceso (GenBank No) JF327847.1), en la que se identificaron el gen *bla*, que codifica para una beta-lactamasa y confiere resistencia a Ampicilina, el origen de replicación ColE1, del plasmidio pBR322 y la secuencia perteneciente al gen *rpsL*, que codifica para la proteína ribosomal S12 de *E. coli*, y confiere sensibilidad a estreptomicina (Tabla 1). Además, se identificó una región homóloga al vector pRK7813 (GenBank No: KC442292.1), que va desde el nucleótido 4936 al 7418 y que contiene el sitio *cos* (por sus siglas en Inglés, cohesive end site) de 233 pb del fago lambda y una secuencia de 112 pb que fue reportada por Guiney y Yakobson, 198310 como la región funcional del origen de transferencia del plasmidio RK2. Dicha región, mostró una identidad de un 100% con las secuencias reportadas en GenBank de los plasmidios pCM51,12 pSET152,13 pIJG902,14 pIMB415 y pPW7815 (Fig. 2). A continuación del OriT, se identificó al gen *traJ* que codifica para la proteína de reconocimiento del OriT. Finalmente, se identificó una región homóloga (desde el nucleótido 7415 al 9517) con un 100% de identidad con el plasmidio pOX-Gen (GenBank No: MF370216.1) que contiene el gen *aacC1* que codifica para la aminoglicósido N(3')-acetiltransferasa I y confiere resistencia a gentamicina, y el gen *gcuP*, que codifica para la N acetiltransferasa GcuP (Tabla 1), dichos genes provienen de la bacteria *Acinetobacter baumannii*16 (Fig.1).

Principales sitios de clonaje del plasmidio pSS1129

Adicionalmente, como sitios útiles para la clonación de fragmentos y genes de interés para la obtención de nuevos mutantes de *B. pertussis*, se identificaron los sitios únicos de corte *XbaI*, *SacI*, *BamHI*, *HindIII*, *ClaI* y *EcoRI*, ubicados en la región entre los genes *gcuP* y *bla*. También, se identificaron otros sitios únicos de corte como, el sitio *NdeI* cuesta abajo del gen *bla*, los sitios *XmaI*, *SmaI* en el extremo 3' del gen *rspL* y los sitios *SalI* y *MluI* en la región entre el gen *rspL* y el OriT (Fig.1). La digestión del pSS1129 con algunas de estas enzimas mostró una única banda de ~10 kb (Fig.3), correspondiente al plasmidio lineal. Los sitios identificados, principalmente los que se encuentran ubicados a continuación del gen *gcuP*, podrían ser utilizados como sitios de clonación de genes de interés para posterior introducción en cepas de *B. pertussis*.

Figura 1.

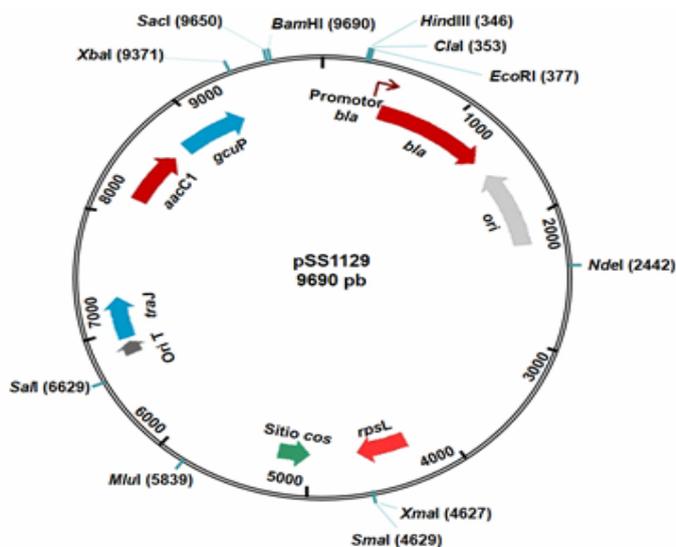
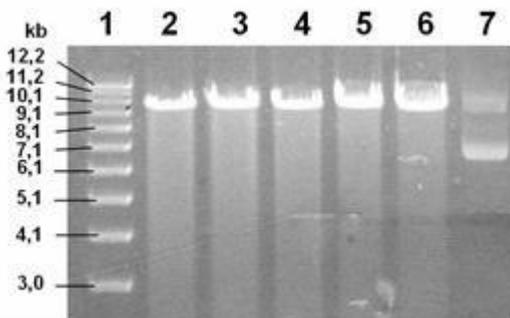


Figura 2.

		2281	2340
pSS1129	(363)	TTGCCCTCATCTGTTAOGCCGGGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
pM51	(467)	TTGCCCTCATCTGTTAOGCCGGGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
PSET152	(1)	-----COGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
pLJ6902	(1)	-----COGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
pMB4	(1)	-----COGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
pPW78	(504)	TTGCCCTCATCTGTTAOGCCGGGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTG	
		2341	2400
pSS1129	(423)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
pM51	(527)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
PSET152	(33)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
pLJ6902	(33)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
pMB4	(32)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
pPW78	(564)	AGCACCGCCAGGTGCGGARTAAGGGACAGTGARGAAGGAACACCCGCTCGGGGTGGGCCT	
		2401	2460
pSS1129	(483)	ACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCGGTTGGATACACCAAGGAAGTCTACACGAACC	
pM51	(587)	ACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCGGTTGGATACACCAAGGAAGTCTACACGAACC	
PSET152	(93)	ACTTCACCTATCCTGCCCGG-----	
pLJ6902	(93)	ACTTCACCTATCCTGCCCGG-----	
pMB4	(92)	ACTTCACCTATCCTGCCCGG-----	
pPW78	(624)	ACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCGGTTGGATACACCAAGGAAGTCTACACGAACC	

Figura 3.



LEYENDA DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Mapa genético del plasmidio suicida pSS1129. En rojo se muestran los genes marcadores que confieren resistencia a ampicilina, gentamicina y sensibilidad a estreptomycin. En gris oscuro se muestra el origen de transferencia OriT y en gris claro el origen del plasmidio pBR322. La región correspondiente al sitio cos se encuentra en verde y el resto de los genes identificados en azul. Además, se muestran los sitios de restricción únicos útiles para clonación.

Fig. 2. Alineamiento obtenido mediante el programa BLASTN para comparar la secuencia correspondiente al origen de transferencia OriT del plasmidio suicida pSS1129 con otras reportadas en la base de datos de genes GenBank. El alineamiento mostró una identidad de un 100 % con la región funcional del OriT de los plasmidios analizados.

Fig. 3. Análisis de restricción de plasmidio pSS1129 con enzimas de interés que presentan sitio único de corte según secuencia nucleotídica. En cada caso se obtiene una única banda de aproximadamente 10 kb. Carrilera 1, Patrón de peso molecular 1 kb ADN Ladder (Invitrogen). Reacciones de digestión con las enzimas: carrilera 2, EcoRI; carrilera 3, HindIII; carrilera 4, BamHI; carrilera 5, Sall y carrilera 6, NdeI. En la carrilera 7, plasmidio sin digerir.

Tabla 1. Principales puntos de referencia del plasmidio pSS1129.

Genes y sitios de interés	Ubicación
Promotor del gen <i>bla</i>	517-586
Secuencia codificadora del gen <i>bla</i> que confiere resistencia a Amp	587-1444
Origen de replicación	1992-2265
Secuencia codificadora del gen <i>rspL</i> que codifica para la proteína ribosomal 30S	4357-4731
Sitio <i>cos</i> del fago lambda	5090-5322
Origen de transferencia	6761-6882
Secuencia codificadora del gen <i>traJ</i>	6915-7286
Secuencia codificadora del gen <i>aacC1</i> que confiere resistencia a Gen.	8161-8625
Secuencia codificadora del gen <i>gcuP</i>	8744-8625

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó por primera vez la secuencia nucleotídica completa del plasmidio suicida pSS1129, el cual presenta un origen de transferencia para su movilidad entre cepas de *E. coli* y *B. pertussis*. Además, contiene los genes que confieren resistencia a ampicilina y gentamicina, así como uno que confiere sensibilidad a estreptomicina, útiles para seleccionar las células en donde ocurrieron eventos de recombinación dobles que permiten el intercambio de material genético entre el plasmidio suicida y el cromosoma de *B. pertussis*. Finalmente, se identificaron varios sitios únicos de restricción para la clonación de genes. Este plasmidio constituye una herramienta ventajosa para la obtención de nuevas generaciones de mutantes de *B. pertussis* con fines vacunales.

Número de acceso de la secuencia de nucleótidos. La secuencia completa del plasmidio pSS1129 fue anotada en la base de datos de secuencias de nucleótidos GenBank con el número de acceso MN057686.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vivian A, Murillo J, Jackson RW. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology*. 2001;147(4):763-80.
- Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:242.
- Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*. 2005;3(9):711.
- Weiss AA, Falkow S. Plasmid transfer to *Bordetella pertussis*: conjugation and transformation. *Journal of bacteriology*. 1982;152(1):549-52.
- Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M, et al. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*. 1986;48(1):119-31.
- Stibitz S, Black W, Falkow S. The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene*. 1986;50(1-3):133-40.
- Stibitz S. [35] Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods in enzymology*: Elsevier; 1994. p. 458-65.
- Proenza-Alfonzo LL, Domínguez KM, Martínez-Loredo Y, Delgado-Egozcue A, Serrano-Rivero Y, Castillo-Casañas Y, et al. Obtención de una cepa de *Bordetella pertussis* mutante del gen *dnt* y productora del toxoide S1-9K/129G. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2015;46(4):360-5.
- Proenza-Alfonzo LL, Marcos-López E, Marrero-Domínguez K, Suzarte-Portal E, Ferrán-Pérez B, Pérez-Bolaños C. LPA0311: cepa de *Bordetella pertussis* modificada genéticamente para la producción del toxoide pertúsico PT-S1-9K/129G. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2015;46(4):353-9.
- Guiney DG, Yakobson E. Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983;80(12):3595-8.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;25(17):3389-402.

- Marx CJ, Lidstrom ME. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 2001;147(8):2065-75.
- Bierman M, Logan R, O'brien K, Seno E, Rao RN, Schonher B. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*. 1992;116(1):43-48.
- Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, et al. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*. 2005;58(5):1276-87.
- Zhu Y, Wang L, Du Y, Wang S, Yu T, Hong B. Heterologous expression of human interleukin-12 in *Streptomyces lividans* TK24 using novel secretory expression vectors. *Biotechnology letters*. 2011;33(2):253-61.
- Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*. 2008;190(24):8053-64.