

Caracterización del sitio *dif1* en la cepa atenuada CRC-13 de *Vibrio cholerae* O139

Talena Ledón, Javier Campos y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Biología Molecular, Dirección de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: talena.ledon@cnic.edu.cu

Recibido: 14 de julio de 2009.

Aceptado: 23 de septiembre de 2009.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O139, vacuna, CTX ϕ , *att*, *dif*.

Key words: *Vibrio cholerae* O139, vaccine, CTX ϕ , *att*, *dif*.

A partir del año 1992, *Vibrio cholerae* del serogrupo O139 ha sido identificado como el agente causal de múltiples brotes epidémicos de cólera en diferentes países asiáticos, incluso en ocasiones, desplazó totalmente a las cepas preexistentes del serogrupo O1.¹ Esta potencialidad epidémica hizo que la Organización Mundial de la Salud planteara la necesidad de disponer de una vacuna contra ese serogrupo.² En este sentido, el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas ha obtenido un grupo de cepas atenuadas que al estudiarlas en modelos animales, exhibieron características fenotípicas promisorias para emplearlas como ingrediente farmacéutico activo (IFA) de una vacuna experimental contra el cólera causado por vibriones del serogrupo O139.^{3,4}

La cepa CRC266 de *V. cholerae* O139, aislada en la India en 2000, fue previamente empleada como cepa de partida para la obtención de mutantes atoxigénicos. Mediante ingeniería genética se suprimió de su cromosoma el profago CTX ϕ que contiene los genes del antes denominado casete de virulencia y como resultado se obtuvo la cepa CRC-13.³ La estructura genética de los profagos CTX ϕ de CRC266 se había caracterizado mediante secuenciación y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP),⁵ lo que reveló la existencia de un tándem de profagos CTX ϕ que incluye copias completas del fago y copias carentes de los genes de la toxina colérica (CT) coexistiendo en el sitio *dif1* (del inglés, *deletion induced filamentation* 1) del cromosoma I de esta cepa. La modificación genética que permitió la remoción del tándem de profagos CTX ϕ se hizo utilizando la tecnología del vector suicida, para lo cual se empleó un plasmidio que permite la supresión del profago CTX ϕ de cualquier cepa de *V. cholerae* por contener las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del profago CTX ϕ (región RS y *ctxB*, respectivamente).³ Teóricamente, de acuerdo con la estructura genética de la cepa CRC266, un proceso de intercambio alélico mediante recombinación homóloga con este vector permitiría la obtención de cepas en que las copias intactas de CTX ϕ organizadas en tándem podrían suprimirse quedando en el cromosoma solo aquellas carentes de los genes

de CT, teniendo en cuenta que el extremo 3' de estas últimas no guarda homología con el vector suicida. Sin embargo, durante el proceso de modificación genética se obtuvieron clones que efectivamente conservaron una parte de la secuencia genómica de CTX ϕ (sin incluir CT) y otros como CRC-13, en los que se suprimieron todas las copias del profago.³ La caracterización genética de CRC-13 como posible cepa IFA de vacuna requiere la identificación de la estructura genética remanente en la zona donde se encontraba el profago. A la vez, dilucidar esta estructura aportaría elementos para sugerir el mecanismo por el cual se generó.

El sitio *dif1* es una región de ADN, de 28 pares de nucleótidos, localizado en el cromosoma 1 de *V. cholerae* que es sustrato de la actividad recombinasa de las enzimas XerC y XerD durante la segregación cromosómica en la división celular.⁶ La remoción del sitio *dif1* del cromosoma bacteriano es una estrategia adoptada para mejorar la seguridad de las cepas vivas atenuadas previstas como IFA de vacunas de cólera, ya que así se suprime el sitio *attB*, por donde suele insertarse establemente el fago CTX ϕ .⁷ Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura remanente en el sitio *dif1* y la región adyacente en el cromosoma de la cepa CRC-13 para completar su caracterización genética, puesto que ella ha sido seleccionada como cepa de partida para obtener nuevas cepas IFA para vacunas de cólera.

La cepa toxigénica CRC266 contiene un plasmidio de bajo número de copias de 4,7 kb llamado plasmidio críptico ligado a la toxina (pTLC, del inglés *toxin-linked cryptic plasmid*) cuya función se ignora.⁸ Este plasmidio se encuentra integrado en dos copias repetidas en tándem inmediatas al extremo 5' del tándem profagos CTX ϕ en el cromosoma bacteriano. Adicionalmente, TLC está flanqueado por secuencias *att* muy similares y adyacentes a las del tándem de copias del profago CTX ϕ .^{8,9}

En relación con el evento que ocasionó la remoción de todas las copias de CTX ϕ en CRC266 durante la obtención de CRC-13, la primera hipótesis que se consideró fue que hubiese ocurrido un proceso de recombinación entre los sitios *att* que flanquean el tándem de profagos CTX ϕ (Fig. 1A, tándem de CTX ϕ). Con el objetivo de identificar

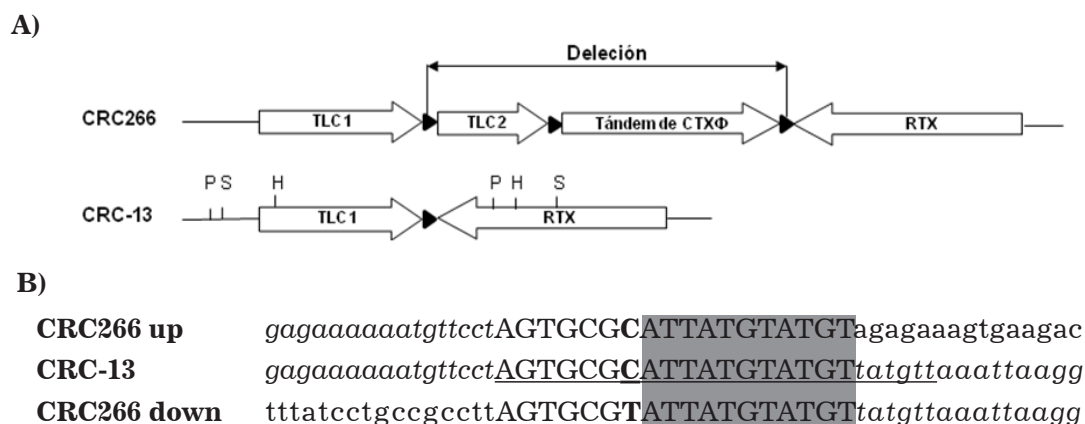


Fig. 1 Determinación de la secuencia del sitio *dif1* en la cepa de *Vibrio cholerae* O139 CRC-13. A) Representación esquemática simplificada de la región próxima al sitio *dif1* en la cepa CRC266 (progenitor toxigénico) y su derivado atoxigénico CRC-13. Las cabezas de las saetas representan los sitios *att* que flanquean una de las copias de TLC y el tándem de profagos CTXφ. La doble saeta indica la región suprimida por la recombinación. Los sitios de restricción relevantes se indican: P, *PstI*; S, *SacI* y H, *HindIII*. B) Alineamiento de las secuencias de las regiones adyacentes a los sitios *att* de la cepa CRC266 localizados cuesta arriba (up) de TLC2 y cuesta abajo (down) del tándem de profagos CTXφ, así como de la región que contiene el nuevo sitio *dif* obtenido en la cepa CRC-13 luego de la recombinación que suprimió el tándem de profagos. Los núcleos de homología entre las tres secuencias (*att*) se muestran en mayúsculas y en negritas, las bases nucleotídicas que difieren. Sombreada en gris aparece la región por donde debió ocurrir el corte y reunión de las cadenas de ADN durante el proceso de recombinación. En letra cursiva se muestran las secuencias de ADN idénticas entre las cepas CRC-13 y CRC266, y subrayada se muestra la secuencia canónica del sitio *dif1* en *V. cholerae*.

Tabla 1. Patrón de fragmentos de restricción de la cepa de *Vibrio cholerae* CRC-13 que contienen secuencias de TLC.

Enzima	Predicción <i>in silico</i> ^{1,3}	<i>Southern blotting</i> ^{2,3}
	Tamaño (kb)	
<i>PstI</i>	14,8	10
<i>SacI</i>	17,2	13
<i>SalI</i>	14,8	9,4
<i>HindIII</i>	11,9	6,6
<i>ClaI</i>	9,7	4,1

¹ Tamaño esperado si la recombinación que permitió la remoción del tándem de profagos CTXφ en la cepa CRC266 hubiese ocurrido entre los sitios *att* que lo flanquean.

² Tamaño del fragmento de restricción identificado por *Southern blotting* con la sonda TLC.

³ Solo se muestran los fragmentos que exhiben diferencias de tamaño entre lo esperado y lo determinado experimentalmente.

la reestructuración ocurrida en la región adyacente al sitio *dif1*, se realizó un estudio por hibridación de ácidos nucleicos de tipo *Southern blotting*, en el que se utilizó como sonda el plasmidio pTLC digerido con la enzima *BglI* (sonda TLC), la cual posee un sitio único en este vector.⁸ El marcaje y detección de la sonda se realizó con el sistema no radioactivo *DIG DNA labeling and detection Kit* (Roche, Suiza). Para facilitar el análisis, se seleccionó un grupo de enzimas de restricción en las que la localización de los sitios de corte en el genoma bacteriano, permitiera la identificación de algún cambio en el tamaño de los fragmentos que contienen parte del genoma de TLC y de la región más próxima ubicada cadena abajo del sitio *dif1*. En este sentido, el ADN cromosómico de la cepa CRC-13 fue digerido con las enzimas *PstI*, *SacI*, *SalI*, *HindIII* y *ClaI*. Se identificaron varios fragmentos, revelados por la sonda TLC, cuya talla se diferenció de la esperada a partir de un análisis predictivo *in silico* con el programa Vector NTI Suite 6000, si la hipótesis considerada fuera verdadera (Tabla 1). Los resultados indicaron la ocurrencia de una supresión de alrededor de 5 kb más de lo esperado respecto al análisis previo,

tamaño que se corresponde con el de la copia de TLC2 localizada cadena arriba del arreglo de profagos (Fig. 1A, TLC2). Este resultado sugirió que la reestructuración ocurrió por supresión del fragmento TLC2 – Tándem de CTXφ (Fig. 1A, CRC266, delección).

Partiendo del supuesto anterior, el sitio *dif1* quedaría contenido en un segmento de ADN ubicado entre TLC1 y el gen RTX (Fig. 1A, CRC-13). Para estudiar el fragmento de ADN que contiene el sitio *dif1* de la cepa CRC-13, se amplificó *in vitro* el ADN de esta región usando como molde ADN de CRC-13. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usaron los oligonucleótidos TLC (5' -GCTGATAGCTTACATGGCAC- 3') y *att down* (5'-CACTTTGGTGCACACAATTGACG- 3') que hibridan con el extremo 3' de TLC y una secuencia de ADN localizada cadena abajo del sitio *dif1* de la cepa CRC266, respectivamente. Como resultado de la PCR se obtuvo un fragmento de ADN de 700 pb que se secuenció por ambas cadenas empleando como cebadores los mismos oligonucleótidos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas con otras disponibles en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>),

correspondientes a la región cuesta abajo del tándem de profagos de la cepa CRC266 y al extremo 3' de la copia de TLC1, empleando también el programa Vector NTI Suite 6000.

El análisis de la secuencia permitió identificar en la cepa CRC-13 la regeneración de un sitio *dif1* cuya secuencia es idéntica a la del sitio *dif1* de *V. cholerae*,¹⁰ el cual incluye un sitio *attB*, que en las cepas O1 y O139 flanquea a una de las copias de TLC (TLC2) y se ubica cadena arriba del tándem de profagos (Fig. 1B, secuencia CRC266 up). El alineamiento de secuencias también indicó que existe un ciento por ciento de identidad entre la secuencia localizada cuesta arriba del sitio *dif* de CRC-13 y la que se ubica cuesta arriba de la copia de TLC2 en CRC266; así como entre las secuencias ubicadas cuesta abajo del sitio *dif* de ambas cepas (Fig. 1B, secuencias en minúscula cursiva). Este resultado, conjuntamente con el de *Southern blotting*, apuntan a que la supresión de la secuencia del profago en esta cepa ocurrió por un evento de recombinación entre la secuencia *att* ubicada entre las copias de TLC y el *att* localizado en el extremo 3' del tándem, suceso que dio lugar a la pérdida de una de las copias de TLC y de todas las copias de CTX ϕ presentes en la cepa CRC266, y a la regeneración del sitio *dif1* en CRC-13. El análisis del alineamiento permitió además, identificar la región donde ocurrió el corte y reunión de las cadenas de ADN durante la recombinación. Esto fue posible ya que los sitios *att* involucrados no son idénticos, sino que tienen una diferencia nucleotídica que permite identificar una secuencia de 11 mer (ATTATGTATGT) donde debió ocurrir el corte y reunión de las cadenas (Fig. 1B, sombreada en gris), aunque el punto exacto no es posible definirlo ya que esta región es muy conservada entre sitios *att*. El hecho de que la supuesta región de corte incluya la región central de 6 pb (GTATGT) que separa los sitios de unión de las recombinasas XerC y XerD, así como los sitios de corte de XerC reportados, permite especular que un evento de recombinación sitio-específica mediado por XerCD provocara la supresión del arreglo de profagos que tuvo lugar durante la modificación genética de CRC266.⁶ En este caso, la formación previa de un cointegrado con el vector suicida debió favorecer este evento, por cuanto se ha reportado que la escisión de CTX a través de XerCD es un proceso irreversible.¹⁰

De este estudio se pudo concluir que la cepa CRC-13 posee un sitio *dif1*, diferente del de CRC266 en un único cambio de bases (Fig. 1B, marcado en negritas), que puede funcionar como sitio para la resolución de dímeros de cromosomas y cuya funcionalidad para la integración de bacteriófagos deberá estudiarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya MK *et al.* Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J Infect Dis.* 1994; 169(5):1029-1034.
2. World Health Organization. Cholera vaccines: a new public health tool? World Health Organization, Geneva, Switzerland WHO/CDS/CPE/ZFK/2004.5, 2004.
3. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Moreno A *et al.* Obtención de mutantes atoxigénicos para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2005;36(3):156-162.
4. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Fando R. Modificaciones genéticas en mutantes atoxigénicos de *Vibrio cholerae* O139 que mejoran sus propiedades como candidatos vacunales. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2007; 38(3):237-43.
5. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Rodríguez BL, Marrero K, Fando R. El Tor and Calcutta CTXphi precursors coexisting with intact CTXphi in *Vibrio cholerae* O139 isolates. *Res Microb.* 2008;159:81-87.
6. McLeod SM, Kimsey HH, Davis BM, Waldor MK. CTXphi and *Vibrio cholerae*: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Mol Microbiol.* 2005; 57(2):347-356.
7. Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera-Oro M, Hyman T *et al.* Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 1995;172(4):1126-1129.
8. Proenza L, Suzarte E, Ledón T, Marrero K, Rodríguez BL, Fando R, Campos J. El plasmidio críptico pTLC de *Vibrio cholerae* podría ser un vestigio evolutivo del genoma de un fago filamentoso. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2007;38(2):142-149.
9. Rubin EJ, Lin W, Mekalanos JJ, Waldor MK. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol.* 1998;28(6):1247-1254.
10. Val ME, 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.* 2005;19(4):559-566.