



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DE LA ISLA GENÓMICA H47 EN AISLAMIENTOS DE ESCHERICHIA COLI UROPATÓGENO: MOVILIDAD Y ASOCIACIÓN CON LA TOXINA DE SHIGA

YAMILA EVANGELINA MARTÍNEZ ACOSTA

Tutora: Dra. María Fernanda Azpiroz Hernández *Sección de Fisiología y Genética bacterianas*

Tribunal: Dra. María Fernanda Azpiroz

Dra. María Eloisa Poey Dra. Gianna Cecchetto

Montevideo, Uruguay

Mayo 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis compañeras de laboratorio por apoyar mi trabajo mientras el mismo fue llevado a cabo en la Sección de Fisiología y Genética Bacterianas. En particular le doy las gracias a María Parente por el apoyo técnico, a Magela Laviña por permitirme realizar mi Tesina de grado en su laboratorio, a María Eloisa Poey por el aporte de datos clínicos de las cepas estudiadas y, a mi tutora María Fernanda Azpiroz por el apoyo brindado y las discusiones que hoy forman parte de este trabajo.

RESUMEN

La isla genómica H47 (IG H47) se encuentra en el cromosoma de la cepa natural *Escherichia coli* H47. Su pequeño tamaño permitió clonarla en vectores multicopia y estudiar su movilidad (cómo se escinde del replicón que la porta e integra en uno nuevo) en el contexto de *E. coli* K12. La isla presenta dos características novedosas: i) no codifica para la enzima responsable de su movilidad, por lo que ésta debe ser aportada por la bacteria que la alberga y ii) está flanqueda por secuencias repetidas directas extensas (sitios *attL* y *attR*) que comparten cinco regiones de identidad, todas ellas sustrato de recombinación. La escisión de la IGH47 se detecta por PCR, amplificando la secuencia híbrida (*attC*) resultante del intercambio genético entre *attL* y *attR* (Amplicón OUT). Dicho amplicón contiene cinco secuencias solapadas producto de la recombinación en los cinco sitios de identidad.

Con el fin de estudiar la movilidad de la IGH47 en contextos naturales, se analizó la cepa de referencia *E. coli* H47 y diez aislamientos de *E. coli* uropatógeno portadores de varios genes de la isla. En todos los casos, se había detectado previamente la aparición del amplicón OUT. En este trabajo se llevó a cabo la secuenciación de los amplicones OUT, revelándose una mayor complejidad en relación al contexto recombinante. Los cromatogramas fueron diversos, portando desde una única secuencia hasta cinco o más secuencias solapadas diferentes. Siempre contuvieron sitios *attC* seguidos de una secuencia igual o con cambios respecto a la de la IG H47 clonada. En virtud de esta gran complejidad, se amplificaron y secuenciaron la mayoría de las regiones que contienen los sitios *attL* y *attR* que flanquean las IGs de tipo H47 presentes en los aislamientos. El análisis de toda la información obtenida permitió plantear un modelo preliminar de la estructura de la IG de tipo H47 y de los sitios *att* portados por *E. coli* H47 y por algunos aislamientos. Concretamente, *E. coli* H47 contendría en su cromosoma un sitio *att* adicional susceptible de recombinar con el *attL* que flanquea la isla.

Por último, el análisis *in sílico* de la presencia de la IG de tipo H47 en genomas totalmente secuenciados evidenció que la isla está presente fundamentalmente en cepas de *E. coli* productoras de toxina de Shiga. Surgió así la hipótesis de una posible vinculación entre la presencia de la IG H47 y la de los determinantes para esta toxina. Se buscaron por PCR las dos variantes de la toxina de Shiga en *E. coli* H47 y en los diez aislamientos, no obteniendo resultado positivo en ningún caso. Por lo tanto, no existiría una estricta vinculación entre la presencia de la isla y la capacidad de producir toxina de Shiga por parte de los aislamientos.

En suma, la isla de tipo H47 es un elemento genético que mediante su capacidad móvil otorga variabilidad genética a la bacteria que la porta, no sólo por su integración y escisión sino también por posibilitar la adquisición o pérdida de segmentos cromosómicos.

ÍNDICE

INTRO	ODUCCIÓN	1
1.1.	Islas genómicas	1
1.2.	Isla genómica H47	3
OBJE.	TIVOS	7
2.1.	Objetivo general	7
2.2.	Objetivos específicos	7
MATI	ERIALES Y MÉTODOS	8
3.1.	Cepas bacterianas	8
3.2.	ADN bacteriano	8
3.3.	Medios de cultivo	8
3.4.	Manipulación y análisis del ADN	9
3.5.	Estrategia para la detección de la escisión de la IG H47 por la técnica	de
P	CR	10
RESU	LTADOS	12
4.1. A	nálisis de la movilidad de la IG de tipo H47 en los diez aislamientos	12
4.2. A	nálisis de los sitios attL y attR en las islas de tipo H47 de los diez	
ientos		18
4.3. A	nálisis <i>in sílico</i> de la presencia de la IG H47 en genomas bacterianos	
nciado	S	20
4.4. A	málisis de la presencia de la toxina de Shiga en <i>E. coli</i> H47 y en los	
ientos		_ 22
DISC	JSIÓN	_23
CONC	CLUSIONES	28
REFEI	RENCIAS	29
ANEX	0	32
	1.1. 1.2. OBJET 2.1. 2.2. MATE 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 3.5. PO RESU 4.1. A 4.2. A dientos DISCU CONC REFEI	OBJETIVOS 2.1. Objetivo general 2.2. Objetivos específicos MATERIALES Y MÉTODOS 3.1. Cepas bacterianas 3.2. ADN bacteriano 3.3. Medios de cultivo 3.4. Manipulación y análisis del ADN 3.5. Estrategia para la detección de la escisión de la IG H47 por la técnica PCR RESULTADOS 4.1. Análisis de la movilidad de la IG de tipo H47 en los diez aislamientos 4.2. Análisis de los sitios attL y attR en las islas de tipo H47 de los diez aientos 4.3. Análisis in sílico de la presencia de la IG H47 en genomas bacterianos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. <u>Islas genómicas</u>

El surgimiento de la genómica ha permitido la creciente secuenciación y análisis de genomas bacterianos, lo que evidenció que cepas de una misma especie difieren en su composición genética. Surge así el concepto de pan-genoma, definido como el conjunto de genes que poseen todas las cepas de una misma especie. El pan-genoma de una especie está compuesto por un genoma básico, compartido por todas las cepas, y un genoma adaptativo, constituido por genes comunes a algunas cepas o incluso específicos de una cepa. El genoma básico codifica para funciones esenciales de la vida de la bacteria, varía poco y está contenido en el cromosoma. Es así que esta porción del pan-genoma sería la que define una especie bacteriana. Por otro lado, el genoma adaptativo codifica para funciones prescindibles de la vida bacteriana (metabolismo secundario), que determinan su estilo de vida. Esta información es altamente variable, está contenida tanto en el cromosoma como en elementos extracromosómicos (plásmidos y bacteriófagos), y con frecuencia se transfiere por herencia horizontal (Mira et al., 2010).

En el cromosoma la información codificada por el genoma adaptativo está contenida en transposones, integrones, profagos e islas genómicas. Las islas genómicas (IGs) son elementos genéticos ampliamente distribuidos en los procariotas. Se tratan de segmentos de ADN de hasta 200 kb de extensión, con un contenido en G+C y uso de codones diferente a los del genoma básico que las porta. Presentan una estructura en mosaico, es decir están integradas por segmentos de ADN de distinta procedencia, y en algunos casos se encuentran insertadas en genes para ARNs de transferencia. Las IGs se caracterizan por estar flanqueadas por secuencias repetidas directas cortas de 9 a 20 pb (sitios de attachment, att) y por contener genes para factores de movilidad como ser integrasas, escisionasas, transposasas y aquéllos involucrados en la movilidad conjugativa. Esto hace que las islas puedan adquirir o perder parte de su información genética así como transferirse horizontalmente de una bacteria a otra como una unidad (Hacker & Kaper, 2000; Dobrindt et al., 2004; Juhas et al., 2009). La transferencia de una IG tiene la siguiente operativa: la isla integrada en el cromosoma de una bacteria donante se escinde por recombinación entre los sitios att que la flanquean y, como molécula circular independiente, se transfiere a una bacteria receptora integrándose en un sitio att de su cromosoma (Fig. 1). En la mayoría de los casos descritos, la escisión e integración de una isla son eventos de recombinación específica de sitio operados por una recombinasa específica de sitio (integrasa), asistida en ocasiones por una escisionasa, ambas codificadas por la IG (Lesic et al., 2004; Hochhut et al., 2006). En la escisión las dos moléculas resultantes, cromosoma sin la isla e isla como molécula circular independiente, portan una secuencia híbrida formada por parte de cada sitio *att* que flanqueaba la isla. Por su parte, la integración sólo tendrá lugar si el cromosoma de la bacteria receptora porta un sitio *att* homólogo al contenido en la isla (*attl*), para hacer posible la recombinación. En numerosos casos se ha detectado la escisión de IGs, siendo siempre eventos de muy baja frecuencia (ca. 10⁻⁵). Es así entonces que la técnica de PCR es el abordaje habitual para el análisis de la movilidad de las islas (Rajanna et al., 2003; Middendorf et al., 2004; Lin et al., 2008).

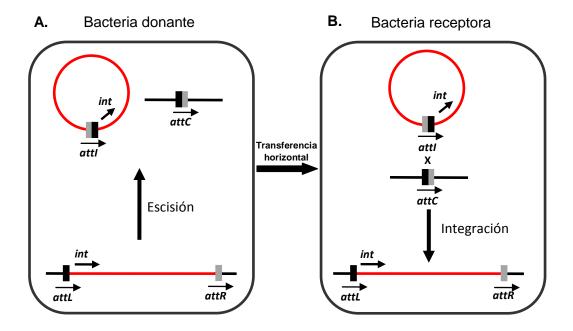


Figura 1. Esquema de la movilidad de una isla genómica. A. Escisión de la isla desde el cromosoma de la bacteria donante. **B.** Integración de la isla en el cromosoma de la bacteria receptora. Línea negra, ADN cromosómico y línea roja, ADN de la isla genómica. Rectángulos negro y gris, repetidos directos que flanquean la isla, *attL* y *attR*, respectivamente. Rectángulos combinados, sitios híbridos entre *attL* y *attR* producto de la recombinación: *attC* se localiza en el cromosoma sin la isla (plataforma vacía) y *attl* es portado por la isla como molécula circular independiente. *int*: integrasa.

Hoy en día se han identificado un gran número de islas genómicas, sin embargo para la mayoría de ellas se desconoce si se transfieren y en tal caso cómo lo hacen. Las pocas descripciones que existen indican que hay IGs que utilizan la transducción y otras la conjugación para transferirse horizontalmente a otras bacterias. En el primer mecanismo, la isla se escinde del cromosoma, se replica y, haciendo uso de la maquinaria de ciertos fagos, se encapsida en partículas virales adaptadas a su tamaño (partículas transductantes). Una vez que la bacteria se lisa las partículas transductantes se liberan y, mediante el contacto con otras bacterias, puede ocurrir la integración de la isla en otro cromosoma (Novick et al., 2010). El

segundo mecanismo es utilizado por IGs que contienen información genética dedicada a la transferencia conjugativa. Así, se describieron los elementos integrativos y conjugativos (ICEs) y los elementos integrativos y movilizables (IMEs). Los ICEs contienen toda la información requerida para llevar adelante su transferencia por conjugación mientras que los IMEs portan parte de la información, por lo que no son capaces de mediar su propia transferencia pero sí pueden ser movilizados por otros elementos conjugativos que le aportan la maquinaria necesaria. En estos casos la bacteria donante establece un par conjugativo con la bacteria receptora a través del que se transfiere la isla como molécula circular independiente. Una vez transferida, la isla se integra en el cromosoma de la bacteria receptora por recombinación específica de sitio entre el *attl* portado por la isla y un *att* homólogo en dicho cromosoma (Burrus et al., 2002; Burrus & Waldor, 2004; Waldor, 2010; Wozniak & Waldor, 2010).

Cabe mencionar que las islas genómicas poseen similitud estructural y operativa con los bacteriófagos temperados, lo que sugiere que tienen un origen fágico. Concretamente, ambos elementos genéticos utilizan la recombinación específica de sitio para integrarse o escindirse del cromosoma bacteriano, siendo los genes para ARNs de transferencia los sitios clásicos de integración. Además, las integrasas y escisionasas de las IGs son altamente homólogas a las correspondientes en bacteriófagos.

Por último, la movilidad de las IGs permite que una bacteria pueda adquirir en un único paso un conjunto de información genética que eventualmente le otorgue la capacidad de desarrollar una determinada estrategia de vida. Esto ha sido particularmente estudiado para el primer tipo de IGs descrito, las islas de patogenicidad (PAIs), que son aquéllas que portan genes para factores de virulencia y están contenidas en el cromosoma de cepas patógenas (Hacker et al., 1997; Schubert et al., 2002; Che et al., 2014). Debido a la versatilidad que estos elementos genéticos le otorgan al genoma bacteriano, el estudio de las islas genómicas es actualmente un área de intensa investigación.

1.2. Isla genómica H47

La isla genómica H47 (IG H47) se identificó inicialmente en la cepa *Escherichia coli* H47, un aislamiento clínico procedente de heces humanas. Muy probablemente la isla se encuentra presente en el cromosoma de dicho aislamiento (Laviña et al., 1990). Dado su pequeño tamaño, 12.635 pb, fue posible clonarla en diferentes vectores plasmídicos multicopia, lo que permitió estudiarla en un contexto conocido, i.e. en una cepa de *E. coli* K12 totalmente secuenciada (contexto recombinante). Concretamente, se clonó de *E. coli* H47 un fragmento HindIII-HindIII de 16.823 pb de extensión, que fue completamente secuenciado (Fig. 2A) (Poey et al., 2006). La IG H47 codifica para la producción de dos antibióticos, microcinas H47 e I47 (MccH47 y

Mccl47), que integran el grupo de microcinas catecol. Este grupo se trata de una familia de antibióticos peptídicos de síntesis ribosómica modificados postraduccionalmente por la adición de un sideróforo de tipo catecol, la salmoquelina. La IG H47 posee un gen de actividad para la MccH47 y otro para la Mccl47, que codifican para los respectivos péptidos precursores; dos genes de inmunidad que protegen a la célula de su propia producción antibiótica; cuatro genes de maduración, cuyos productos están implicados en la formación de la molécula catecol salmoquelina y su unión al péptido precursor, y dos genes de secreción, que codifican para un sistema de exportación del antibiótico. La producción de Mccl47 se evidencia en condiciones de deprivación de hierro (Poey et al., 2006).

En cuanto a la estructura de la isla, una de sus características particulares es que está flanqueada por dos repetidos directos extensos e imperfectos que comparten 76% de identidad (Fig. 2B). Esta característica es particular de la IG H47, ya que la mayoría de las islas genómicas poseen repetidos directos cortos e idénticos.

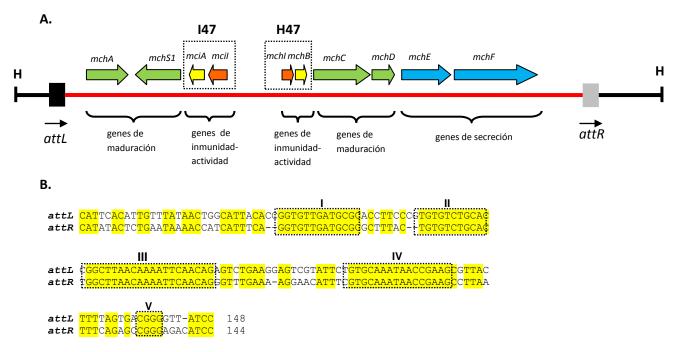


Figura 2. Isla genómica H47 y regiones adyacentes. A. Representación esquemática del fragmento HindIII-HindIII de 16.823 pb (AC: AJ009631). Con rectángulos, secuencias repetidas directas (attL y attR) que flanquean la isla. Con flechas de distintos colores, genes que componen la isla. Recuadrado, parejas de genes de inmunidad-actividad para las microcinas H47 el47. H: HindIII.**B.** Alineamiento de las secuencias repetidas directas attL y attR de 148 y 144 pb, respectivamente. En amarillo, nucleótidos idénticos; con recuadro, los cinco sitios de recombinación.

Se comprobó que la isla genómica H47 tiene la capacidad de movilizarse. Concretamente, en contexto recombinante la isla se escinde de la molécula que la porta así como se integra en una nueva molécula por recombinación. Ambos fenómenos se detectaron

usando la técnica de PCR, gracias al diseño de oligonucleótidos que amplificaban únicamente los productos del intercambio genético. Se dilucidó así que la IG H47 presenta dos características novedosas: i) la escisión de la isla ocurre por recombinación en cinco regiones de identidad entre los repetidos directos que la flanquean, generando cinco secuencias híbridas diferentes (attC y attl) y ii) no contiene ningún gen para integrasa, por lo que dicha función debe ser aportada por el contexto genético de la bacteria que la hospeda. Asimismo, se constató la movilidad de la isla en la cepa natural *E. coli* H47 (Azpiroz et al., 2011).

Al momento de iniciar este trabajo, la comparación de la secuencia de la IG H47 contra los bancos de datos reveló que varias cepas de E. coli, fundamentalmente patógenas, portaban en su cromosoma secuencias vinculadas a la isla. Dos cepas de E. coli totalmente secuenciadas, 042 (enteroagregativa) y 0104:H4 (enteroagregativa productora de toxina de Shiga), contienen la IG H47 de forma completa (Chaudhuri et al., 2010; Ahmed et al., 2012). En E. coli 042 la isla es casi idéntica a la presente en E. coli H47 (99% de identidad), incluyendo las secuencias repetidas directas. En el caso de la cepa O104:H4, se mantiene una alta homología (98% de identidad) excepto a nivel del sitio attL, que conserva indemnes solo las regiones de recombinación IV y V. Además, la IG H47 está presente muy probablemente de forma completa en la cepa parcialmente secuenciada E. coli CA46: la secuencia no se extiende hasta el sitio attR por lo que no se puede afirmar que dicho sitio se conserve (AC: AJ515251.1). Por su parte, otras cepas totalmente secuenciadas de E. coli contienen secuencias parciales de la IG H47, conservando siempre el sitio attR. Por último, se han encontrado plataformas vacías (sitios att) en varias cepas de E. coli e incluso, en una cepa de Salmonella enterica. Cabe mencionar que en varios casos una misma cepa porta más de una secuencia vinculada a la IG H47, i.e. una isla incompleta junto con una o más plataformas vacías o varias plataformas vacías con distinto nivel de conservación (Azpiroz et al., 2011; Azpiroz, resultados no publicados).

En un relevamiento realizado en nuestro laboratorio se identificaron diez aislamientos clínicos de *E. coli* procedentes de urocultivos que portan muy probablemente una IG de tipo H47. Por análisis fenotípico y genotípico se determinó que, si bien sólo cinco de los aislamientos producen MccH47, todos ellos contienen el gen de actividad para este antibiótico (*mchB*) y los genes de maduración *mchA* y *mchS1*. En base a esta característica, junto con el grupo filogenético al que pertenecen y el contenido de genes de urovirulencia, se clasificó a estos aislamientos en el perfil II de urovirulencia (Tabla 1) (Poey et al., 2012). Asimismo se realizó un análisis preliminar de la capacidad de movilizarse de las supuestas islas de tipo H47 portadas por estos aislamientos. Efectivamente, en todos ellos se detectó el amplicón que evidenciaría la plataforma vacía (*attC*) remanente en el cromosoma luego de la escisión de la

isla (amplicón OUT) (Bascuas, 2011). Por lo tanto, se refuerza la hipótesis de que estos diez aislamientos de *E. coli* uropatógeno portan en su cromosoma una IG de tipo H47 móvil.

Dado que en este trabajo se estudió también la existencia de una vinculación entre la presencia de la IG H47 y la condición de codificar para la toxina de Shiga, a continuación se describen sucintamente las características de esta toxina. La toxina de Shiga es de naturaleza proteica, siendo una de las toxinas más potentes que se conoce por su gran capacidad de generar daño tisular. Integra el grupo de las toxinas A-B ya que está compuesta por dos subunidades, la A es la encargada de la toxicidad y la B es la que interacciona con la superficie de la célula eucariota diana. Su mecanismo de acción consiste en detener la síntesis proteica de las células eucariotas mediante el corte del ARN ribosomal. Asimismo, es potencialmente capaz de incrementar la respuesta inflamatoria generando daño endotelial, lo que puede dar lugar al cuadro clínico denominado síndrome urémico hemolítico. Esta toxina es producida por Shigella dysenteriae y por diferentes cepas patógenas de E. coli. Todas las cepas de E. coli que producen toxina de Shiga integran el grupo denominado "Shiga-toxin Escherichia coli" (STEC), siendo la cepa O157:H7 la más estudiada. En todos los casos los determinantes genéticos para la toxina están contenidos en bacteriófagos de tipo lambdoide integrados en el cromosoma. En particular, en E. coli se reconocen dos variantes principales de la toxina, STX-1 y STX-2, presentes de manera individual o conjunta en las diferentes cepas. Cada variante está codificada por un operón compuesto por los genes para la subunidad A y B de la toxina (Creydt et al., 2006; Bai et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar la presencia de una IG de tipo H47 con capacidad móvil y de los genes para la toxina de Shiga en diez aislamientos de *E. coli* uropatógeno.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la movilidad de las islas de tipo H47 portadas por los diez aislamientos mediante la secuenciación nucleotídica de los amplicones que evidencian los productos de escisión.
- II. Determinar la presencia y la secuencia nucleotídica de los sitios *attL* y *attR* en las islas de tipo H47 de los diez aislamientos.
- III. Analizar la presencia de la IG H47 en otras bacterias mediante una búsqueda actualizada en los bancos de datos.
- IV. Analizar por PCR la presencia de las dos variantes de la toxina de Shiga en *E. coli* H47 y en los diez aislamientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

Se emplearon diez aislamientos clínicos de *E. coli* uropatógeno pertenecientes a la colección del laboratorio (Tabla 1). Se utilizaron como cepas de referencia *E. coli* H47, portadora de la isla en su cromosoma y, *E. coli* K12 W3110, carente de la IG H47 y de genes *stx*.

3.2. ADN bacteriano

Se utilizó una extracción de ADN genómico de un aislamiento de *E. coli* O157:H7 (cedido gentilmente por el Dr. Gustavo Varela, Facultad de Medicina), positivo para las dos variantes de la toxina de Shiga.

Tabla 1. *E. coli* H47 y aislamientos de *E. coli* uropatógeno positivos para la amplificación OUT (versión simplificada de Poey et al., 2012)

Aislamiento	Prod. Antibiótica	Genes microcina			Grupo filo-	Genes de virulencia			
	(MccH47)	mchAS1	mciA	mchB	mchC	genético ¹	Fimbrias	Adquisición de Fe*1	Citotoxinas
H47	+	+	+	+	+	Α	-	+	-
II-1	+	+	+	+	+	Α	-	+	-
II-2	+	+	+	+	+	B1	-	-	-
II-3	+	+	+	+	+	B1	-	-	-
11-4	+	+	+	+	+	D	-	-	-
II-5	+	+	+	+	+	B1	-	+	-
II-6	-	+	+	+	+	Α	+*	+	-
II-7	-	+	-	+	-	Α	-	+	-
II-8	-	+	+	+	+	Α	-	+	-
11-9	-	+	+	+	+	Α	-	+	_
II-10	-	+	+	+	+	А	-	+	+*2

¹ Según Clermont et al., 2000

3.3. Medios de cultivo

Las cepas se crecieron siempre en medio rico Luria Bertani (LB) (Miller, 1992).

Contiene por litro de solución:

Bactotriptona	10g
Extracto de levadura	5,0g
NaCl	10g

En caso de medio sólido se agregaron 15g de agar.

^{*} Positivo para los genes del operón *pap*(fimbrias P)

^{*1} Positivo para ihal (receptor de catecoles) y para los genes iutA (receptor de aerobactina) y/o fyuA (receptor de yersiniabactina)

^{*2} Positivo para hly (hemolisina)

3.4. Manipulación y análisis del ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un cultivo en 2ml de LB a 37°C crecido toda la noche. Dado el rendimiento diferencial en la extracción de ADN de acuerdo al aislamiento, se utilizaron dos kits: "Wizard genomic DNA purification system" (Promega) y "QIAprep Spin Miniprep" (Qiagen). La resolución del ADN genómico y de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en geles de agarosa de 0,6% y 2%, respectivamente, utilizando buffer TAE 1X. Las corridas se realizaron en el rango de 50V-80V según los tamaños de ADN a resolver.

Para las reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa U-Taq (SBS Genetech) en un volumen final de 30μl. Las mezclas de reacción contuvieron buffer U-Taq 10X, 200μM de cada desoxinucléotidotrifosfato, 500nM de cada oligonucleótido, 0,6 U de ADN polimerasa y como molde de 50 a 100ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 segundos, temperatura de asociación por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por dos minutos. Los oligonucléotidos de síntesis, temperaturas de asociación, tamaños y nombres de los amplicones se muestran en la Tabla 2. En algunos casos se realizaron PCRs anidadas, usando el producto de la primera amplificación como molde para una segunda, de modo de aumentar la concentración de amplicón obtenido.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en las reacciones de amplificación

Oligonucléotido	Secuencia (5'-3')	Tm asoc. (°C)	Tamaño amplicón (pb)	Nombre amplicón	Referencia
out 1	CCGTTCATTTTCCTGCTGACCC	60	316	OUT	Azpiroz et al., 2011
out2	TCTGTTGCCCGTTGATGTTTCCT				p , -
in 1	GTTTGTAGGAGCTTTCTTTTTG	53	762	IN	Azpiroz et al., 2011
in 2	CGCTGATGACTGTTTTTATGTTG				·
in 1	GTTTGTAGGAGCTTTCTTTTTG	55	412	izquierdo	Azpiroz et al., 2011
out 1	CCGTTCATTTTCCTGCTGACCC				
in 2	CGCTGATGACTGTTTTTATGTTG	57	665	derecho	Azpiroz et al., 2011
out 2	TCTGTTGCCCGTTGATGTTTCCT				
VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	50	130	VT1	Pollard et al., 1990
VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA				
VT2a	TTAACCACACCCACGGCAGT	58	346	VT2	Pollard et al., 1990
VT2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT				

Para el estudio de la presencia de los determinantes para la Toxina de Shiga se utilizaron dos pares de oligonucléotidos que amplifican las dos variantes de la toxina *stx1* y *stx2*. La variante 1 se analizó mediante la amplificación de un fragmento de 130 pb (amplicón VT1) que comprende parte de los genes codificantes para las subunidades A y B de la toxina. La variante 2 se detectó por la presencia de un fragmento de 346 pb (amplicón VT2)

correspondiente a la amplificación de parte del gen que codifica para la subunidad A de la proteína.

Los productos de PCR fueron purificados con "QIAEXII Gel extraction kit" (Qiagen) y cuantificados con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La secuenciación nucleotídica se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. En el caso del amplicón OUT se usó el cebador out1 para la secuenciación y para los amplicones izquierdo y derecho los oligonucleótidos out1 y out2, respectivamente.

Para el análisis *in sílico* se utilizó el programa computacional BLASTN (Altschul et al., 1997).

3.5. Estrategia para la detección de la escisión de la IG H47 por la técnica de PCR

Debido a quela escisión de una IG es un evento de muy baja frecuencia, se utiliza la técnica de PCR para su detección. Concretamente, se diseñan dos parejas de oligonucleótidos de síntesis que hibridan a los lados de los repetidos directos attL y attR, dando lugar a la amplificación solo cuando la IG se ha escindido, ya que de otra manera los fragmentos a amplificar serían demasiado extensos e imposibles de obtener. Cada amplicón portará entonces una secuencia híbrida: el sitio attC contenido en el cromosoma (plataforma vacía) o el sitio attl presente en la isla como molécula circular independiente. En particular, la escisión de la IG H47 se analiza por PCR utilizando los oligonucleótidos "out" e "in", disponibles en el laboratorio (Fig. 3) (Azpiroz et al., 2011). La amplificación con los oligonucleótidos out da lugar a un fragmento que contiene el sitio attC remanente en el cromosoma y la reacción con los in genera un amplicón que posee el sitio attl albergado por la isla como molécula independiente. Tanto el amplicón OUT como el IN abarcan secuencias adyacentes a un lado y otro del attC y attl, respectivamente, un dato que será relevante a la hora de interpretar los resultados. Cabe mencionar que la presencia del amplicón OUT puede evidenciar la escisión de la isla, en cuyo caso se espera obtener una banda tenue de amplificación, o la existencia de una plataforma de integración vacía en el cromosoma del aislamiento, generándose muy probablemente una banda fuerte de amplificación. En suma, sólo aquellos aislamientos que den lugar a ambos tipos de amplicones (OUT e IN) evidenciarán la presencia de una IG de tipo H47 móvil.

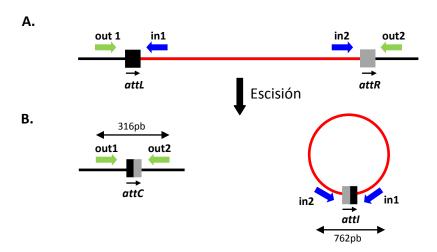


Figura 3. Estrategia para la detección de la escisión de la IG H47 por la técnica de PCR.A. Isla integrada en el cromosoma. Con líneas roja y negra, IG H47 y ADN cromosómico, respectivamente. Con flechas verde y azul, cebadores out e in, respectivamente. **B.** Productos de la escisión: cromosoma sin la isla e isla como molécula circular independiente, ambos portando una secuencia híbrida. Se indica con flechas de dos puntas los amplicones OUT e IN.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de la movilidad de la IG de tipo H47 en los diez aislamientos

Como se mencionó anteriormente, la escisión de la IG H47 se estudia mediante la obtención de los amplicones OUT e IN que evidencian ambos productos del intercambio genético. Se sabía que los diez aislamientos en estudio daban lugar a un amplicón OUT, siendo en su mayoría bandas de amplificación tenues, a excepción de II-2 y II-3, que presentaban bandas fuertes (Bascuas, 2011). Vale recordar que la escisión de la IG H47 en contexto recombinante multicopia ocurre en cualquiera de los cinco sitios de identidad entre attL y attR, por lo que los amplicones OUT e IN contienen una mezcla de cinco secuencias solapadas attC y attI, respectivamente (Anexo). Por lo tanto, en primer lugar era de interés dilucidar la secuencia nucleotídica de los amplicones OUT derivados de cada aislamiento de modo de verificar que portan sitios attC, reconocer si están completos y en qué región de identidad ocurre la recombinación. Es así entonces que se extrajo el ADN genómico de los diez aislamientos para utilizarlo como molde en las reacciones de PCR. En todos los análisis se utilizó E. coli H47 como cepa de referencia. Se realizó la amplificación con los cebadores out a partir del ADN genómico de cada aislamiento y los amplicones resultantes se purificaron desde gel de agarosa para ser enviados al servicio de secuenciación. Cabe mencionar que esta etapa fue muy dificultosa ya que para poder secuenciar se necesita un mínimo de concentración del fragmento purificado. Dado que el rendimiento de la amplificación en la mayoría de los aislamientos fue muy bajo, se debieron realizar varias reacciones de PCR desde un mismo ADN genómico, usando volúmenes altos de molde, y así poder extraer la suma de todas ellas (amplicón OUT simple). En varios casos no se alcanzaron las cantidades necesarias de amplicón para la secuenciación, por lo que se recurrió a hacer reacciones anidadas (amplicón OUT anidado). En el caso de E. coli H47 y de algunos aislamientos se secuenció más de un amplicón OUT.

Se secuenciaron los amplicones OUT de *E. coli* H47 y de nueve aislamientos, evidenciándose una gran complejidad. Concretamente, se obtuvieron dos tipos de cromatogramas, ambos portando sitios *attC*: con una única secuencia y con cinco o incluso más secuencias solapadas. Este resultado fue totalmente inesperado ya que en contexto natural monocopia se preveía obtener un cromatograma de secuencia única que evidenciara la recombinación en el sitio más frecuente. Más aún, en varios casos en los que se obtuvo y secuenció más de un amplicón OUT surgido a partir de una misma cepa se obtuvieron secuencias diferentes. Para los aislamientos II-4, II-5, II-8 y II-9 se obtuvieron cromatogramas en los que se logró identificar las cinco secuencias *attC* solapadas evidenciadas previamente en

contexto recombinante. En estos casos la secuencia "downstream" a la región attC fue idéntica a la de la IG H47 clonada a excepción de la del aislamiento II-4 que portó varios cambios. Para este grupo de cepas la información provino de la secuenciación de un único amplicón OUT anidado. Para los aislamientos II-2 y II-3 el cromatograma reveló una única secuencia portadora de un sitio attC, que en II-3 es claramente un attC_{IV}. Ambas secuencias contuvieron cambios tanto dentro de la región attC, fundamentalmente fuera de los sitios de recombinación, como pasada dicha región (Figs. 4 y 5). Esta variación en la secuencia es la que impide dilucidar qué tipo de attC porta el aislamiento II-2. Para cada una de estas cepas la información surgió de un único amplicón OUT simple, ya que la banda de amplificación es fuerte en ambos casos. Cabe aclarar que se secuenciaron dos amplicones OUT simples obtenidos de forma independiente para cada una de estas cepas, siendo idéntico el resultado. Para los restantes aislamientos (II-1, II-6 y II-10) así como para la cepa de referencia E. coli H47 la información de secuencia fue aún más compleja. En estos casos se secuenciaron dos amplicones OUT por cepa, uno anidado y otro simple para E. coli H47 y II-6, y dos simples para II-1 y II-10. Sorprendentemente, los cromatogramas provenientes de una misma cepa evidenciaron secuencias diferentes. El resultado más contundente fue el de E. coli H47: un amplicón dio lugar a las cinco secuencias solapadas (attC_{I-V}) seguidas de una secuencia idéntica a la clonada, mientras que el otro generó un cromatograma de secuencia única conteniendo un sitio attC_{III} y una secuencia adyacente con mutaciones en relación al segmento clonado (Fig. 6). Para los restantes aislamientos de este grupo (II-1, II-6 y II-10) los amplicones surgidos desde una misma cepa revelaron básicamente la misma información obtenida para E. coli H47. Si bien en ningún caso hubo cromatogramas de secuencia única, sí fue clara la diferencia pasado el sitio attC. Concretamente, los cromatogramas con secuencia downstream diferente a la clonada contenían varias secuencias attC, generalmente con predominio de una de ellas (Fig. 7). Para el aislamiento II-7 no se pudo obtener la cantidad suficiente de amplicón OUT para su secuenciación.

Para completar el estudio de la escisión de la isla de tipo H47 en los diez aislamientos restaba obtener la información del amplicón IN, que evidencia la isla como molécula circular independiente. Esta etapa suponía una gran dificultad dado que, a la baja frecuencia del evento de escisión, se sumaba el hecho de que la molécula a identificar no es autorreplicativa. Se procedió a la amplificación del fragmento IN desde el ADN genómico de cada aislamiento, teniendo éxito sólo para II-2 y II-3. En estos casos no fue posible la secuenciación dado el bajísimo rendimiento en las reacciones. Este mismo inconveniente impidió secuenciar el amplicón IN derivado de *E. coli* H47. Para los restantes aislamientos se intentó varias veces pero no se logró obtener amplificación IN.

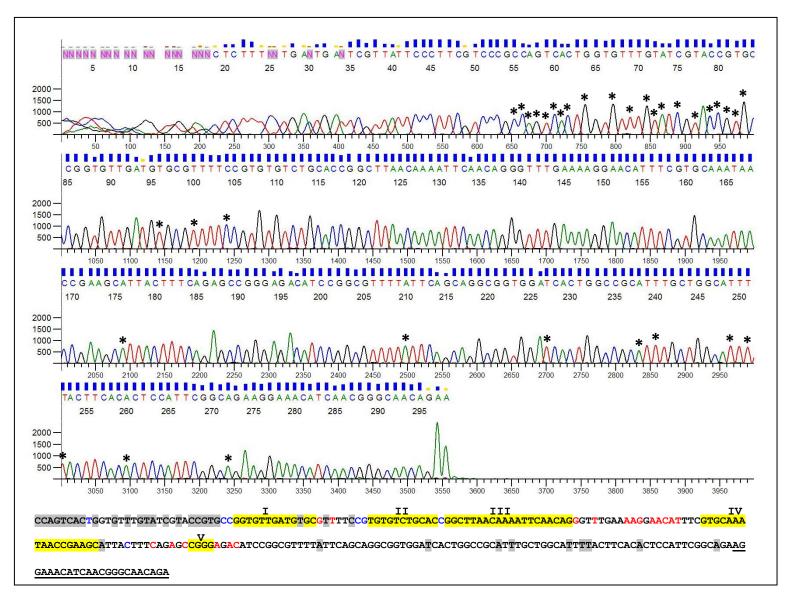


Figura 4. Cromatograma y secuencia nucleotídica del amplicón OUT surgido del aislamiento II-2. En azul y rojo se indican los nucleótidos específicos de *attL* y *attR*, respectivamente, y en amarillo los cinco sitios de recombinación. Se subraya la secuencia complementaria al cebador out2. Los cambios nucleotídicos portados por el aislamiento en relación a la secuencia del amplicón OUT producto de la escisión de la IG H47 en contexto recombinante se pintan en gris en la secuencia y se indican con un asterisco en el cromatograma.

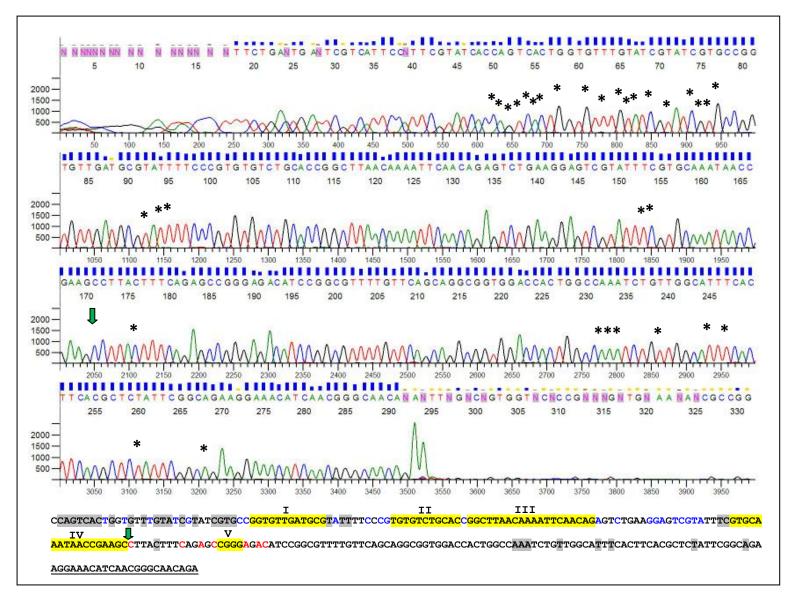


Figura 5. Cromatograma y secuencia nucleotídica del amplicón OUT surgido del aislamiento II-3. El código de colores y signo se consigna igual que en la Fig. 4. Con flecha verde se indica el primer cambio nucleotídico que evidencia la recombinación en el sitio IV.

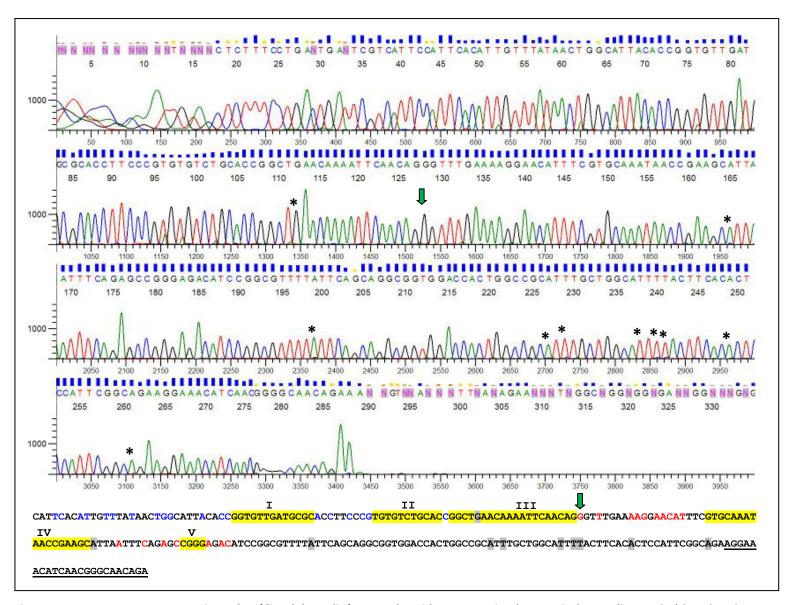


Figura 6. Cromatograma y secuencia nucleotídica del amplicón OUT obtenido por PCR simple a partir de *E. coli* H47. El código de colores y signo se consigna igual que en la Fig. 4. Con flecha verde se indica el primer cambio nucleotídico que evidencia la recombinación en el sitio III.

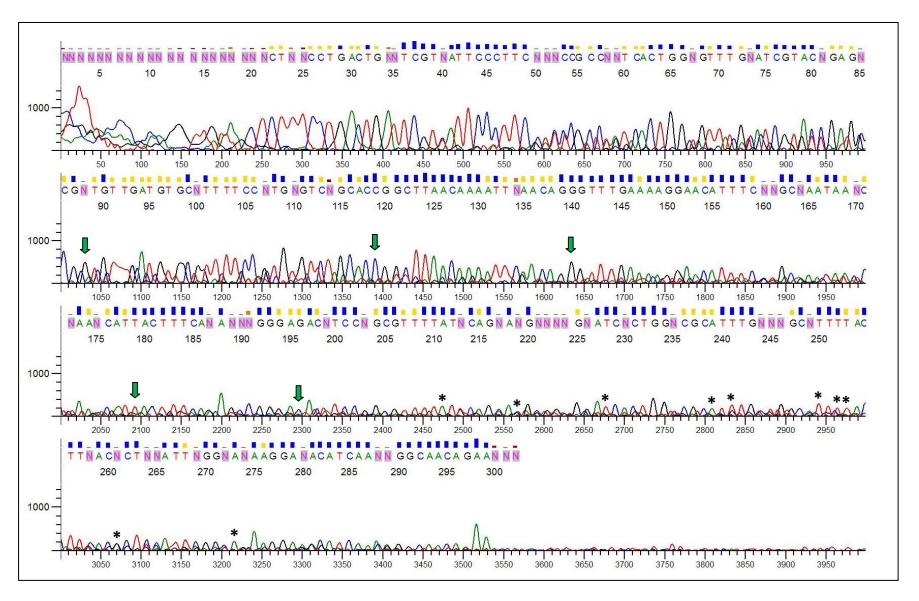


Figura 7. Cromatograma del amplicón OUT obtenido por PCR simple a partir del aislamiento II-6. Con flechas verdes se indica el cambio nucleotídico que evidencia la recombinación en los respectivos sitios de identidad. Con asterisco se señalan los cambios nucleotídicos portados por el aislamiento en relación a la secuencia del amplicón OUT producto de la escisión de la IG H47 en contexto recombinante.

17

4.2. Análisis de los sitios attL y attR en las islas de tipo H47 de los diez aislamientos

Debido a los complejos resultados obtenidos del análisis de los amplicones OUT y a la imposibilidad de tener información de los amplicones IN, surgió la necesidad de conocer más acerca de estas islas. En este sentido, se procedió a analizar la presencia y la secuencia nucleotídica de los sitios attL y attR que flanquean las islas de tipo H47 en los diez aislamientos. Para ello, se realizaron amplificaciones usando los oligonucleótidos out1 x in1, para obtener un fragmento que contiene una secuencia attL (Amplicón izquierdo), y los oligonucleótidos out2 x in2, para obtener un fragmento portador de una secuencia attR (amplicón derecho) (Tabla 2) (Fig. 3). Ocho aislamientos fueron positivos para ambos amplicones y en los restantes dos se obtuvo sólo uno de ellos, el derecho para II-6 y el izquierdo para II-8 (Fig. 8). Asimismo, no todas las amplificaciones fueron secuenciadas, ya que en algunos casos no se logró alcanzar la cantidad requerida para la secuenciación. Se generaron amplicones izquierdos a partir de nueve aislamientos, en su mayoría iguales en tamaño al surgido de E. coli H47, a excepción de los aislamientos II-8 (amplicón de menor tamaño), y II-7 y II-10 (amplicones de mayor tamaño) (Fig. 8A). Se secuenciaron siete amplicones, siendo sus secuencias idénticas a la de la IG H47 (attL_{IGH47}) a excepción del aislamiento II-7, que portó un attL marcadamente diferente pero idéntico al de E. coli O104:H4 (Tabla 3) (Fig. 9). En este caso, el attL porta inserciones de 43 pb en total, lo que concuerda con el leve retraso en su migración en gel de agarosa. Por otra parte, nueve aislamientos dieron lugar a amplicones derechos, de seis se obtuvo secuencia, siendo en todos los casos prácticamente idéntica a la de la IG H47 ($attR_{IGH47}$) (Tabla 3)(Fig. 8B).Nótese que los aislamientos con $attR_{\text{IGH47}}$ son justamente los que presentaron sitios $attL_{\text{IGH47}}$ y en su mayoría producen MccH47.

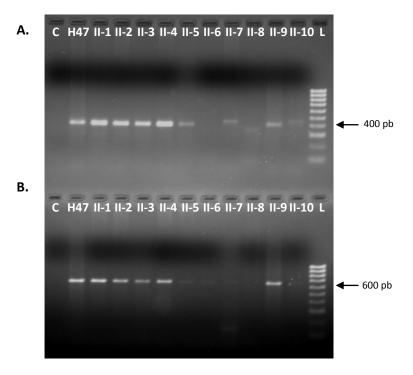


Figura 8. Análisis de la presencia de los sitios *attL* y *attR* de tipo IG H47 en los diez aislamientos. A. Amplificación del fragmento izquierdo (412 pb) y B. Amplificación del fragmento derecho (665 pb). C: control sin ADN molde; H47: *E. coli* H47; II-1 a II-10: numeración según aislamientos; L: Hyper Ladder 100pb (Bioline).

Tabla 3. Producción antibiótica y sitios att que flanquean la IG de tipo H47 en los diez aislamientos

Aislamiento	Producción MccH47	Amplicón izq.	Amplicón der.
II-1	+	+ IG H47	+ IG H47
II-2	+	+ IG H47	+ IG H47
II-3	+	+ IG H47	+ IG H47
11-4	+	+ IG H47	+ IGH47
II-5	+	+ IG H47	+ IG H47
II-6	-	-	+
II-7	-	+ IG O104:H4	+
II-8	-	+	-
II-9	-	+ IG H47	+ IG H47
II-10	-	+	+

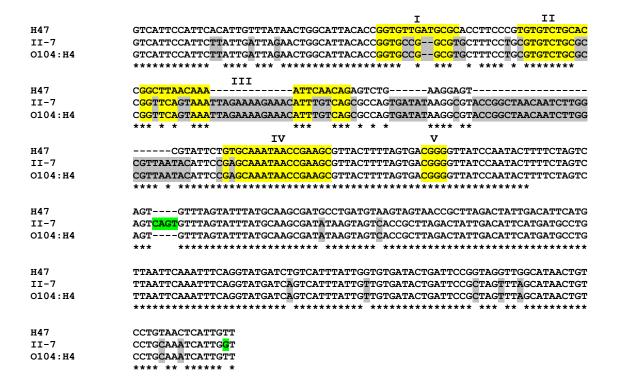


Figura 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los amplicones *attL* presentes en *E. coli* H47, II-7 y *E. coli* O104:H4. Se utilizó el programa Clustal W versión 2.0 (Larkin et al., 2007). Con asterisco se marcan los nucleótidos idénticos entre las tres cepas. En amarillo se pintan los cinco sitios de recombinación, en gris los cambios compartidos por el aislamiento II-7 y *E. coli* O104:H4, y en verde los nucleótidos específicos de II-7.

4.3. Análisis in sílico de la presencia de la IG H47 en genomas bacterianos secuenciados

A finales de 2014se realizó una nueva búsqueda de la IG H47 en los bancos de datos, encontrándose que 26 cepas de *E. coli*, todas ellas productoras de toxina de Shiga (STEC), contenían la isla o parte de ella en su cromosoma (Fig. 10). Estas cepas integran un grupo de 97 STEC, denominadas FHI, cuyos genomas completos fueron incluidos recientemente en los bancos de datos (Haugum et al., 2014). Concretamente, una cepa de este grupo porta la IG H47 prácticamente idéntica (99% de identidad) a la de *E. coli* H47 y otras cinco contienen la isla completa pero con algunos cambios, i.e. el sitio *attL* conservando las regiones IV y V, los genes para la producción de MccH47 con varios cambios y el sitio *attR* indemne. Por otra parte, dos cepas contienen islas de tipo H47 más degeneradas: con el sitio *attL* conservando las regiones IV y V, una secuencia de inserción (IS) insertada en algún gen para la producción antibiótica y el sitio *attR* indemne. Cabe mencionar que en una de ellas (FHI102) la isla de tipo H47 es idéntica a la presente en el cromosoma de las cepas de *E. coli* O104:H4. En otra cepa se encontró la isla con la siguiente estructura: los sitios *attL* y *attR* totalmente conservados y dos

ISS, una en el gen de inmunidad y otra en el gen de exportación para la MccH47. Por último, 17 cepas STEC presentan parte de la IG H47: el sitio *attL* conservando las regiones IV y V, y los genes *mchA* (completo) y *mchS1* (interrumpido por una IS) seguidos del sitio *attR* indemne. Cabe mencionar que esta estructura es justamente la que contienen en su cromosoma las cepas de *E. coli* O157:H7 secuenciadas. Además, se analizó en las 97 cepas FHI la presencia de sitios *att* vinculados a la IG H47, i.e. secuencias idénticas o muy similares a las de los sitios *att* que flanquean la isla. Tres cepas con la isla integrada (FHI23, FHI65 y FHI71) y una que no posee la isla (FHI98) presentaron un sitio *att* adicional, o sea una secuencia nucleotídica homóloga a la de los sitios *attL*, *attR* o *attC* de tipo IG H47 localizada en otra región del cromosoma. Esta misma búsqueda se realizó para las cepas previamente analizadas *E. coli* 042 y O104:H4. Sólo en la primera se encontraron sitios *att* adicionales.

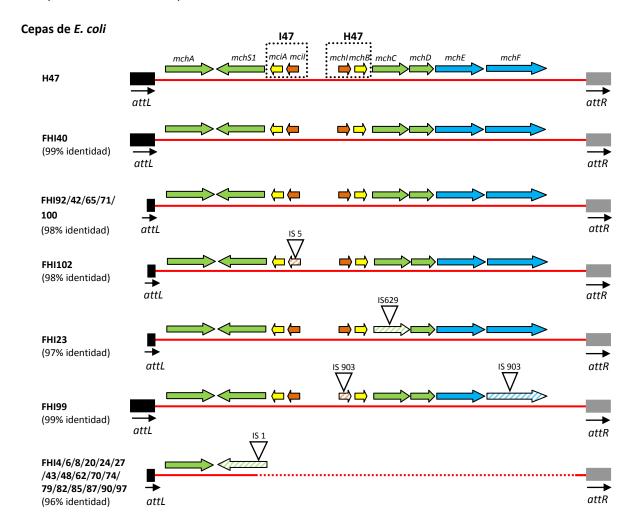


Figura 10. Comparación de la secuencia nucleotídica de la IG H47 contra los bancos de datos. Arriba se representa la IG H47 presente en *E. coli* H47. Abajo, se muestran las estructuras de las IGs de tipo H47 contenidas en el cromosoma de algunas cepas STEC FHI. Con flechas se representan los genes para la producción antibiótica y sus homólogos en las cepas STEC FHI, siguiendo los códigos de colores de la Fig. 2. La línea punteada une segmentos de alta similitud pertenecientes al mismo microorganismo. Con triángulos invertidos se indica la inserción de una IS y el gen mutado se pinta con trama diagonal.

4.4. Análisis de la presencia de la toxina de Shiga en *E. coli* H47 y en los aislamientos

En virtud del análisis de secuencia en el que se evidenció que la IG de tipo H47 está presente de forma completa en varias cepas STEC, nos planteamos la hipótesis de que existiera una vinculación entre la presencia de la isla y la de los determinantes para la producción de toxina de Shiga. Es así entonces que se buscaron los genes de las dos variantes para la producción de toxina de Shiga en *E. coli* H47 y en los diez aislamientos. Se utilizó como referencia la amplificación de ambas variantes a partir del ADN genómico de un aislamiento de *E. coli* O157:H7 y como control de no amplificación se empleó el ADN genómico de *E. coli* K12 W3110. Se obtuvieron los amplicones de tamaño esperado para cada variante cuando se utilizó el ADN genómico procedente de *E. coli* O157:H7, mientras que no hubo amplificación a partir de *E. coli* K12 W3110. No se obtuvieron los amplicones VT1 y VT2 ni para *E. coli* H47 ni para ninguno de los diez aislamientos, por lo que ninguna de estas cepas portaría los determinantes genéticos vinculados a la producción de toxina de Shiga.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró obtener información acerca de la movilidad de las IGs de tipo H47 presentes en el cromosoma de E. coli H47 y de diez aislamientos de E. coli uropatógeno. Mediante la secuenciación de los amplicones OUT surgidos de estos contextos naturales se evidenció una gran complejidad. Este resultado fue totalmente inesperado y contrastó con el perfil perfectamente reproducible obtenido en contexto recombinante. Cabe recordar que la escisión de la isla H47 clonada da lugar a amplicones OUT e IN con cinco secuencias solapadas producto de la recombinación en las cinco regiones de identidad entre los sitios attL y attR que la flanquean, siendo predominante la recombinación en el sitio de identidad III (Anexo) (Azpiroz et al., 2011). Teniendo en cuenta que la escisión es un evento de baja frecuencia y que el contexto natural es monocopia, se esperaba obtener secuencias OUT e IN únicas producto de la recombinación más frecuente. Por el contrario, los cromatogramas de amplicones OUT contuvieron una única secuencia para algunos aislamientos o cinco o más secuencias solapadas para otros. En todos los casos se identificaron secuencias attC seguidas, ya sea de una secuencia idéntica a la de la isla clonada o de una con varios cambios. Más aún, cuando fue posible secuenciar dos amplicones OUT a partir de un mismo aislamiento, en algunos casos se obtuvieron cromatogramas diferentes. En primer lugar, estos hallazgos confirman que las islas de tipo H47 presentes en los contextos naturales ensayados son móviles. Además, se pudo evidenciar que la escisión ocurre por recombinación en cualquiera de los cinco sitios de identidad, y que en cada uno de estos sitios el intercambio genético sería lo suficientemente frecuente como para ser detectado por PCR. Por su parte, la identificación de secuencias "downstream" al attC diferentes a la de la IG H47 clonada estaría dando cuenta de la existencia de un sitio att adicional en el cromosoma de E. coli H47 y de algunos aislamientos. Esta interpretación sólo fue posible gracias al análisis de los sitios att que flanquean las islas de tipo H47 presentes en las cepas estudiadas. En base a los resultados más concluyentes se plantea a continuación un modelo preliminar de la estructura genética de la IG H47 y de los sitios att portados por E. coli H47 y por algunos aislamientos.

Para *E. coli* H47 se obtuvieron dos cromatogramas diferentes surgidos de amplicones OUT tenues. Aquél con cinco *attC* sin cambios posteriores sería producto de la recombinación entre *attL* y *attR*, al igual que lo obtenido previamente en contexto recombinante (Anexo). El segundo cromatograma, que contiene un solo *attC* seguido de una secuencia con cambios, podría interpretarse de dos maneras: sería producto de la recombinación entre *attL* y el sitio *att* adicional, en cuyo caso sólo se habría amplificado el resultado de la recombinación en la

región de identidad III (Fig. 6), o sería una plataforma vacía que se amplifica poco debido a que los oligonucleótidos out no hibridarían en su totalidad. Para poder discernir entre estas dos posibilidades sería necesario obtener información de las regiones flanqueantes al sitio att adicional de manera de determinar si se conservan las secuencias complementarias a los cebadores out. En suma, proponemos que E. coli H47 contendría en su cromosoma una IG H47 y un sitio att adicional, por lo que la escisión de la isla podría darse no sólo entre los sitios att que la flanquean sino además con el sitio att adicional. En este último caso la recombinación implicaría no sólo la pérdida de la IG H47 sino también la del fragmento cromosómico comprendido entre la isla y el sitio att adicional (Fig. 11). Muy probablemente esta misma estructura sea la que portan los aislamientos II-1, II-6 y II-10, para los que se obtuvieron dos cromatogramas diferentes, con y sin cambios luego del attC. Para el aislamiento II-1 esta hipótesis se refuerza por el hecho de que los amplicones izquierdo y derecho son idénticos a los de la isla clonada. En el caso de los otros dos aislamientos no se contó con esta información, ya sea porque no hubo amplificación o porque su intensidad fue insuficiente para la secuenciación. Considerando que los oligonucleótidos out hibridan (se obtienen amplicones OUT), la única explicación sería que la secuencia interna de la isla, i.e. complementaria a los cebadores in, no se conserva en estos dos aislamientos. Por último, se sumaría a este grupo el aislamiento II-4, para el que la única secuencia OUT obtenida reveló cambios luego del attC y las regiones izquierda y derecha son casi idénticas a las de la IG H47 clonada.

En el caso de los aislamientos II-2 y II-3 se obtuvo un único cromatograma portando un sitio attC seguido de una secuencia que contuvo básicamente los mismos cambios identificados en la secuencia downstream del sitio att adicional de E. coli H47. Dado que en ambos casos la secuencia procedió de un amplicón OUT fuerte, cabía la posibilidad de que se tratara de la existencia de un sitio att adicional o de una escisión incrementada de la isla. Teniendo en cuenta que para ambos el amplicón IN fue tenue y que los amplicones izquierdo y derecho fueron idénticos a los de la isla clonada, los resultados indicarían la presencia de un sitio att adicional. Por lo tanto, estos aislamientos portarían en su cromosoma una isla de tipo H47 con capacidad móvil y un sitio att adicional (Fig. 11). La fuerte amplificación del sitio att adicional evidencia la conservación de las regiones diana de los cebadores out, lo que muy probablemente acapara la amplificación impidiendo detectar los productos de la escisión de la isla. Vale aclarar que se secuenciaron dos amplicones OUT independientes para cada aislamiento, surgiendo el mismo resultado.

Para los restantes aislamientos sólo se secuenció un amplicón OUT que dio lugar a un cromatograma idéntico al obtenido en contexto recombinante, lo que da cuenta de la presencia de una IG de tipo H47 con capacidad móvil. Justamente, para dos de ellos (II-5 y II-9)

se dilucidó que las secuencias izquierda y derecha son de tipo IG H47. En el caso de II-8 sólo hubo amplificación izquierda tenue y de menor peso molecular, lo que indicaría que la secuencia downstream al *attL* está algo variada. Recordando lo obtenido para *E. coli* H47 y algunos aislamientos, un cromatograma OUT igual al surgido de contexto recombinante es insuficiente para descartar que existan sitios *att* adicionales. Por lo tanto, sería necesario realizar más secuenciaciones OUT para poder plantear un modelo de la estructura de la isla de tipo H47 y de posibles sitios *att* adicionales en el cromosoma de estos aislamientos.

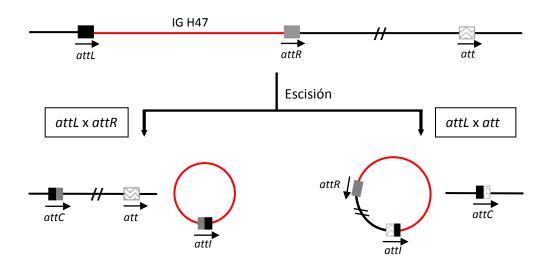


Figura 11. Modelo de la estructura genética de la IG H47 y de sus sitios att portados por E. coli H47 y por algunos aislamientos. Arriba, representación esquemática de la estructura genética de la IG H47 y de los sitios att en la cepa E. coli H47. Abajo, posibles productos de escisión de la IG H47 resultantes de la recombinación entre distintos sitios att. El código de colores y signos se consigna igual que en la Fig. 3. En rectángulo con trama se representa el sitio att adicional y con barras inclinadas se indica el segmento cromosómico de extensión desconocida.

En cuanto al aislamiento II-7, si bien sólo se cuenta con la secuencia del amplicón izquierdo, ésta resultó ser muy informativa: es casi idéntica a la presente en las islas de tipo H47 de *E. coli* O104:H4, FHI102, FHI23 y en las del grupo de FHI92 (Fig. 10). Asumiendo que la estructura de la isla en II-7 fuera similar a la de estas cepas secuenciadas, era esperable obtener amplicones derecho y OUT muy tenues debido a que la región de hibridación del cebador out2 está muy poco conservada en dichas cepas. Por su parte, se sabía previamente que este aislamiento no produce ninguna microcina ya que no contiene indemnes los genes *mciA* (codificante para el péptido tóxico de la Mccl47) y *mchC* (involucrado en la maduración antibiótica) (Tabla 1). Por lo tanto, la estructura de la IG de tipo H47 en II-7 no sería idéntica a ninguna de las presentes en las cepas secuenciadas: FHI102 y el grupo de FHI92 producirían

MccH47 mientras que FHI23 sería incapaz de producir MccH47 pero mantiene indemne el gen *mciA* (Fig. 10).

El análisis de las regiones izquierda y derecha de las islas de tipo H47 reveló que la movilidad sería independiente de la conservación completa de los sitios att, i.e. el aislamiento II-7 porta una isla móvil aunque no conserva indemnes las cinco regiones de identidad del sitio attL (Fig. 9). Este resultado era esperable dado que ya se constató que en contexto natural la escisión de la IG de tipo H47 puede resultar de la recombinación en cualquiera de los cinco sitios de identidad. Además, la movilidad de la isla es independiente de la producción antibiótica ya que, si bien se obtienen amplicones OUT para todos los aislamientos, solo la mitad de ellos son productores de MccH47. Aún así, parece existir una vinculación entre la integridad de los genes y la de los sitios att que conforman las islas. En este sentido, todos los aislamientos productores de MccH47 portan sitios attL y attR casi idénticos a los de la IG H47 clonada mientras que aquéllos negativos o tenues para alguno de los amplicones son incapaces de producir antibiótico (Tabla 3). Estos hallazgos sugieren a priori que existiría una conservación conjunta del fenotipo de producción antibiótica y de los sitios att que flanquean la isla. Sin embargo, esta vinculación no sería estricta ya que el aislamiento II-9 conserva los sitios attL y attR de la IG H47 clonada pero no produce antibiótico. Nótese que esto mismo ocurriría en la cepa FHI99, la que si bien conserva los sitios attL y attR, no produciría antibiótico debido a las inserciones en dos genes de la isla (Fig. 10). Asimismo, para las cepas del grupo FHI92 también sucedería una disociación, en este caso se estima que habría producción antibiótica, ya que todos los genes de la isla están indemnes, pero el sitio attL no se conserva. El análisis in sílico no sólo fue importante para discutir algunos aspectos de la estructura de las islas de tipo H47 sino que además permitió reforzar la hipótesis previamente planteada de que las cepas que la portan serían patógenas intestinales de E. coli (Poey et al. 2012). Al inicio de la tesis sólo se conocían dos cepas totalmente secuenciadas, E. coli 042 (enteroagregativa) y E. coli O104:H4 (enteroagregativa productora de toxina de Shiga), que portaban una IG de tipo H47 completa y conservada en su cromosoma (Chaudhuri et al., 2010; Ahmed et al., 2012). Recientemente se sumaron los genomas completos de un grupo importante de cepas STEC (FHI), encontrándose que varias de ellas portan también una IG de tipo H47 muy conservada (Fig. 10). Esta distribución de la isla en cepas STEC nos llevó a analizar si existía una vinculación entre su presencia y la de los determinantes para la toxina de Shiga. El hecho de no haber identificado ninguna de las dos variantes para la toxina ni en E. coli H47 ni en ninguno de los diez aislamientos indica que de existir una vinculación, la misma no sería estricta.

Por último, si bien el análisis de secuencia revela la co-ocurrencia de la IG H47, completa o parcial, junto con sitios att adicionales en el cromosoma de varias cepas de E. coli,

es en este trabajo donde se demuestra que la isla es capaz de movilizarse utilizando los sitios att adicionales. El caso más claro fue el de nuestra cepa de referencia *E. coli* H47. Estos hallazgos dan cuenta de que las islas de tipo H47 serían promotoras de variabilidad genética, propiciando la pérdida o adquisición de segmentos cromosómicos. Cabe mencionar que no hemos encontrado hasta el momento estudios similares en la literatura. Lo más cercano son las investigaciones sobre la movilidad de las islas genómicas utilizando sitios att secundarios, i.e. sitios de secuencia distinta a la que portan los sitios att que flanquean la isla (Wozniak & Waldor, 2010; Menard & Grossman, 2013). Por lo tanto, si bien se carece de la información de la presencia de sitios att adicionales para otras islas genómicas, no descartamos que existan IGs con una estructura similar a la de la IG H47, y que por ende, promuevan el mismo tipo rearreglos genéticos.

6. CONCLUSIONES

- 1. Se identificaron islas de tipo H47 con capacidad móvil en el cromosoma de diez aislamientos de *E. coli* uropatógeno.
- 2. La movilidad de la isla en contexto monocopia cromosómico natural evidenció una gran complejidad, contrastando con el perfil de recombinación perfectamente reproducible que ocurre en el contexto multicopia recombinante.
- La movilidad de las islas de tipo H47 resultó ser independiente de la conservación de su estructura genética y del fenotipo de producción antibiótica de los aislamientos que la portan.
- 4. La presencia de la IG H47 de forma conservada parece concentrarse en cepas STEC. Sin embargo, no se encontró una vinculación estricta entre la presencia de la isla y la de los determinantes para la toxina de Shiga.
- 5. En E. coli H47 y en algunos aislamientos se detectó un sitio att adicional, susceptible de recombinar. Dicho intercambio genético "alternativo" implicaría no sólo la pérdida de la isla sino también la de segmentos cromosómicos adyacentes de extensión desconocida.
- 6. La isla de tipo H47 es un elemento genético que mediante su capacidad móvil otorga variabilidad genética a la bacteria que la porta, no sólo por su integración y escisión sino también por posibilitar la adquisición o pérdida de segmentos cromosómicos.

7. REFERENCIAS

Ahmed, S.A., Awosika, J., Baldwin, C., Bishop-Lilly, K.A., et al. 2012. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. PloS ONE 7:e48228.

Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25(17):3389-402.

Azpiroz, M.F., Bascuas, T. & Laviña, M. 2011. Microcin H47 system: An *Escherichia coli* small genomic island with novel features. PloS ONE 6: e26179.

Bai, X., Zhao, A., Lan, R., Xin, Y., et al. 2013. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in yaks (Bosgrunniens) from the Qinghai-Tibetan Plateau, China. PloS ONE8:e65537.

Bascuas, T. 2011. Sistema genético microcina H47: una isla genómica de *Escherichia coli* con características novedosas. Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. & Guédon, G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol. Microbiol. 46: 601-610.

Burrus, V. & Waldor, M.K. 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res. Microbiol. 155: 376-386.

Chaudhuri, R.R., Sebaihia, M., Hobman, J.L., Webber, M.A., et al. 2010. Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. PloS ONE 5:e8801.

Che, D., Wang, H., Fazekas, J. & Chen, B. 2014. An Accurate Genomic Island Prediction Method for Sequenced Bacterial and Archaeal Genomes. J. Proteomics Bioinform. 7:214-221.

Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4555-4558.

Creydt, V. P., Nuñez, P., Boccoli, J., Silberstein, C., et al. 2006. Role of the Shiga toxin in the hemolytic uremic syndrome. Medicina 66: 11-15.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nature Reviews Microbiology 2:414.

Hacker, J., Blum-Ochler, G., Mühldorfer, I. & Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol. Microbiol. 23:1087-1097.

Hacker, J. & Kaper, J.B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. 54: 641-679.

Haugum, K., Johansen, J., Gabrielsen, G., Brandal, L. T., et al. 2014. Comparative Genomics to Delineate Pathogenic Potential in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Patients with and without Haemolytic Uremic Syndrome (HUS) in Norway. PLoS ONE 9:e111788.

Hochhuth, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., et al. 2006. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Mol. Microbiol. 61: 584-595.

Juhas, M., Van der Meer, JR., Gaillard, M., Harding, RM., et al. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS Microbiol. 33: 376-393.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23: 2947-2948.

Laviña, M., Gaggero, C. & Moreno, F. 1990. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. J. Bacteriol 172: 6585-6588.

Lesic, B., Bach, S., Ghigo, J., Dobrindt, U., et al. 2004. Excision of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* requires the combined actions of its cognate integrase and Hef, a new recombination directionality factor. Mol. Microbiol. 52: 1337-1348.

Lin, T., Lee, C., Hsieh, P., Tsai, S. & Wang, J. 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICE*Kp1*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. J. Bacteriol. 190: 515-526.

Menard, KL. & Grossman, AD. 2013. Selective Pressures to Maintain Attachment Site Specificity of Integrative and Conjugative Elements. PLoS Genet. 9:e1003623.

Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrint, U., et al. 2004. Inestability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. J. Bacteriol. 186: 3086-3096.

Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Mira, A., Martín-Cuadrado. A. B., D'Auria, G. & Rodríguez-Valera. F. 2010. The bacterial pangenome: a new paradigm in microbiology. Int. Microbiol. 13: 45-57.

Novick, R.P., Christie. GE. & Penadés, JR. 2010. The phage-related chromosomal island of Gram-positive bacteria. Nature Rev. 8: 541-551.

Poey, M.E., Albini, M., Saona, G. & Laviña, M. 2012. Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. Microbial Pathogenesis 52: 292-301.

Poey, M.E., Azpiroz, M.F. & Laviña, M. 2006. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 1411-1418.

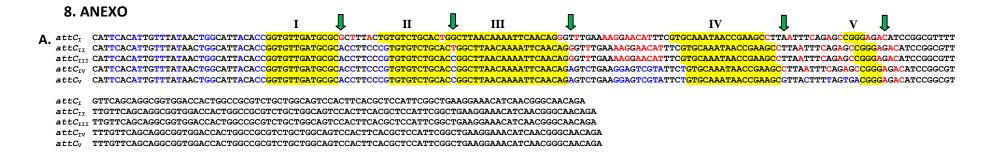
Pollard, D.R., Jhonson, W.M., Lior, H., Tyler, S.D., et al. 1990. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *E. coli* by the polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28: 540-545.

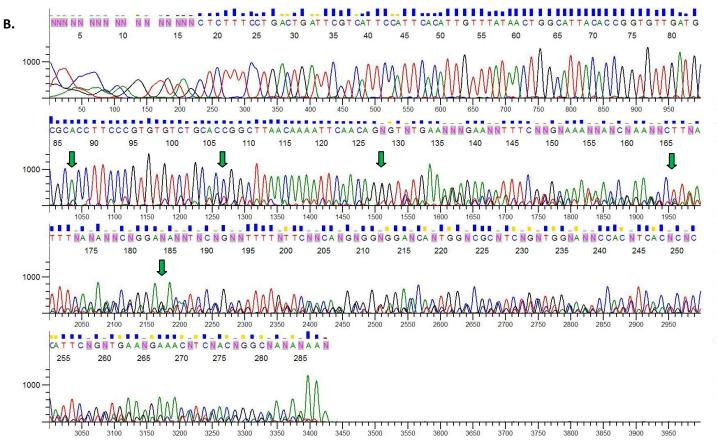
Rajanna, C., Wang, J., Zhang, D., Xu, Z., et al. 2003. The *Vibrio* pathogenicity island of epidemic *Vibrio cholera* forms precise extrachromosomal circular excision products. J. Bacteriol. 185: 6893-6901.

Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heeseman, J., et al. 2002. *Yersinia* high-pathogenicity islan contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Infection and Immunity 70: 5335-5337.

Waldor, M.K. 2010. Mobilizable genomic islands: going mobile with *oriT* mimicry. Mol. Microbiol. 78: 537-540.

Wozniak, R.A.F., & Waldor, M.K. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nature Rev. 8: 552-563.





Secuencias nucleotídicas (A) surgidas del cromatograma (B) de un amplicón OUT obtenido en contexto recombinante. Amplicón obtenido a partir de un ADN plasmídico con la IG H47 clonada, propagado en células de E. coli K12 W3110. Dicho amplicón de purificó de gel de agarosa y se secuenció con el cebador out1.Se obtiene una mezcla se cinco secuencias solapadas, que contienen cada una un sitio attC distinto según la región de identidad donde ocurrió la recombinación. Arriba, en azul y rojo se pintan los nucleótidos específicos de attL y attR, respectivamente, y en amarillo los cinco sitios de recombinación. Abajo, con flechas verdes se indica el cambio nucleotídico que evidencia la recombinación en cada sitio.