

COMUNICACIÓN CORTA

Estudio de la funcionalidad de ToxR en cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O139

Talena Ledón-Pérez, Beatriz Ferrán-Pérez y Rafael Fando-Calzada.

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

Recibido: 19 de abril de 2010.

Aceptado: 15 de junio de 2010.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O139, vacuna, *toxR*, OmpT, OmpU.
Key words: *Vibrio cholerae* O139, vaccine, *toxR*, OmpT, OmpU.

Vibrio cholerae es el agente causal de la enfermedad diarreica aguda conocida como cólera. Esta patología es provocada por los serogrupos O1 y O139, variantes toxigénicas del microorganismo que colonizan el intestino humano y producen la toxina del cólera. Con el objetivo de obtener una cepa viva que pueda ser utilizada como ingrediente farmacéutico activo (IFA) de una vacuna contra *V. cholerae* O139, el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas ha obtenido un grupo de cepas atenuadas que, al ser evaluadas en modelos animales, han mostrado características fenotípicas que avalan su empleo en una formulación vacunal. Entre esas cepas se encuentran CRC3222, CRC3223 y CRC3241, las cuales se obtuvieron luego de sucesivas modificaciones genéticas dirigidas, en primer lugar, a su atenuación y luego, a mejorar, en términos de bioseguridad, sus características como ingrediente activo.¹

Mediante técnicas de ingeniería genética se suprimió el profago CTX ϕ del cromosoma de la cepa toxigénica CRC266, el cual contiene los genes del antes denominado casete de virulencia.² Como resultado de esta manipulación genética se obtuvo la cepa CRC13.³ Para facilitar la identificación de las cepas vacunales en estudios de campo, se insertó de manera estable el gen *celA*, de la especie bacteriana *Clostridium thermocellum*, en el locus del gen *hapA* de CRC13. De esa forma, se obtuvieron los clones CRC131, CRC132 y CRC134. Teniendo en cuenta su índice de colonización en el modelo de ratón neonato, la cepa CRC132 fue posteriormente seleccionada para obtener una nueva generación de cepas atenuadas, más seguras desde el punto de vista ambiental.

Es conocido que la pilina MSHA participa en la formación de biopelículas sobre superficies bióticas o abióticas, así como en la adherencia al zooplancton,^{4,5} funciones estas que contribuyen a la supervivencia bacteriana en el ambiente externo al hospedero. Tomando en consideración estos elementos, se seleccionó el gen *mshA*, que codifica para la subunidad estructural de dicha pilina, como blanco para la obtención de la nueva generación de cepas atenuadas. Otra razón que se tuvo en cuenta fue que la MSHA es además el receptor del

fago VGJ ϕ , el cual es capaz de diseminar los genes de la toxina del cólera hacia cepas que expresan la MSHA y convertir las cepas atoxigénicas en patogénicas.^{6,7} En este sentido, se realizó el remplazamiento alélico del gen salvaje *mshA* de CRC132 por una variante mutada y se obtuvieron los clones CRC3222, CRC3223 y CRC3241.¹

La expresión coordinada de un gran número de genes, en respuesta a cambios o estímulos ambientales, reviste vital importancia para la adaptación de *V. cholerae* a los disímiles ambientes donde se desarrolla. Esta respuesta es el resultado de la acción rigurosa de un sistema de regulación en forma de cascada.^{8,9} Dentro de los factores de transcripción vinculados al control de la virulencia se destacan TcpP y ToxR, proteínas transmembranosas de unión al ADN que controlan la expresión del gen *toxT*, regulador a su vez, de varios genes muy importantes, entre los que se encuentran los que codifican el factor de colonización TCP y la toxina del cólera.^{8,10} ToxR además está involucrada en la regulación de los genes que codifican las porinas OmpU y OmpT, las cuales deben ser expresadas en una proporción adecuada durante el proceso de patogenia, ya que ayudan a la adaptación del microorganismo al entorno intestinal humano.¹¹⁻¹³

Teniendo en cuenta que las proteínas de membrana externa OmpT y OmpU (Omp, del inglés *outer membrane protein*) se encuentran bajo el control directo de ToxR y que la alteración de su patrón de expresión pudiera indicar problemas en la expresión de dicho regulador, el objetivo de este trabajo fue estudiar la funcionalidad de ToxR en los mutantes Δ CTX ϕ *hapA mshA*, a través del análisis del patrón de proteínas de membrana externa, particularmente, las porinas mayoritarias de esta estructura: OmpT y OmpU.

En este trabajo, los patrones proteicos de los mutantes Δ *mshA* CRC3222, CRC3223 y CRC3241 de *V. cholerae* O139 y los correspondientes a los parentales CRC266, CRC13 y CRC132, al crecerlos en medio LB, fueron analizados por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), sobre la base de que la presencia de ToxR mantiene activa la expresión de OmpU y reprimida la expresión

de OmpT (Fig. 1). La cepa salvaje CRC266 y la atenuada CRC13 presentaron el patrón típico de aquellas cepas que poseen el alelo salvaje del gen *toxR*, como el de C7258, utilizada como control en el experimento. Todas ellas expresan OmpU como proteína mayoritaria y cantidades apenas detectables de OmpT (Fig. 1A, carriles U, 1 y 2). Sin embargo, en los casos del clon CRC132 y sus derivados Δ *mshA*, se detectó la expresión tanto de OmpT como de OmpU (Fig. 1A, carriles del 3 al 6). Por otro lado, el patrón típico de los mutantes del gen *toxR*, representado por la cepa 638, se caracteriza por la expresión exclusiva de OmpT (Fig. 1, carril T).^{14,15}

Existen reportes de que sustituciones sitio-específicas en determinados residuos aminoacídicos, localizados en la porción amino-terminal de ToxR, reducen la actividad de la proteína en relación con la de las cepas salvajes.¹⁶ Es por ello que, aun cuando el patrón de Omp exhibido por CRC132 y sus derivados no se correspondió con el de la cepa 638, mutante *toxR*, se consideró la hipótesis de que pudiera haber ocurrido una mutación aleatoria en CRC132 que afectara parcialmente la funcionalidad de la proteína ToxR, sin llegar a inhabilitar su función reguladora. Esta mutación colateral, heredada por sus derivados Δ *mshA*, pudo dar lugar al desarrollo de un fenotipo intermedio en el que se expresan concentraciones elevadas tanto de OmpU como de OmpT, cuando estas cepas son cultivadas en medio LB. Otro elemento que se tuvo en cuenta al considerar esta hipótesis fue el hecho de que estas cepas no se infectan *in vitro* con el fago CTX ϕ .¹⁷ Este fago utiliza como receptor la fimbria TCP, y ToxR es un regulador positivo de la cascada de activación de la expresión de esta pilina.^{2,8}

Para evaluar dicha hipótesis, el gen *toxR* de las cepas CRC13, CRC132 y CRC134 se amplificó mediante PCR empleando los oligonucleótidos CNC-7107 5'-cgg gat cca ttg aga ctc-3' y CNC-7108 5'-gct cta gat gtg tct att ttg c-3', que hibridan 180 nucleótidos cadena arriba del ATG y 11 nucleótidos cadena abajo del codón de parada de *toxR*, respectivamente. La cepa CRC134 se incluyó en este análisis por cuanto había mostrado una franca atenuación de su capacidad colonizadora en el modelo del ratón lactante.¹ A pesar de las diferencias en el patrón electroforético de Omp de la cepa CRC132 y sus derivados Δ *mshA* con el del parental atoxigénico CRC13, todos ellos poseen índices de colonización similares.¹

Como resultado de la PCR, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1 000 pb, que fue secuenciado por ambas cadenas empleando como cebadores los mismos oligonucleótidos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas con la del gen *toxR* de la cepa C7258, disponible en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) y se identificó un fragmento de 763 pb, a partir del extremo 5' del gen, cuya secuencia fue comprobada por ambas cadenas. En el estudio se empleó el programa Vector NTI Suite 6000. El análisis de las secuencias correspondientes a las cepas CRC132 y CRC13, y su comparación con la secuencia de *toxR* de la cepa C7258, mostró que no existen diferencias en este gen entre aquellas cepas que muestran fenotipos salvajes en cuanto al patrón de proteínas de membrana externa (Fig. 1, carriles U, 1 y 2) y CRC132. Sin embargo, el gen *toxR* de la cepa CRC134 tiene una citosina de más a continuación del codón 106, lo que implica un corrimiento del marco de lectura y la síntesis de 20 aminoácidos diferentes a partir de ese punto, hasta el codón de parada (Fig. 2). Es interesante el hecho de que la cepa 638, mutante *toxR* que expresa únicamente OmpT, tiene una citosina de menos en ese mismo codón (codón 106) y, al igual que CRC134, muestra una atenuación en su capacidad colonizadora.¹⁵ La transformación de la cepa CRC134 con el gen *toxR in trans* permitiría determinar si el defecto en su capacidad colonizadora se relaciona con la mutación observada en el gen *toxR*, pero este experimento no se realizó, ya que esa cepa fue descartada como candidato vacunal debido a su discapacidad en la colonización. En el caso de la cepa 638, la transformación con el gen *toxR in trans* restauró el fenotipo de su parental C7258 en cuanto al patrón de proteínas de membrana externa y la capacidad de colonizar adecuadamente el intestino del ratón neonato.¹⁵

Este resultado sugiere que el gen *toxR* pudiera ser un gen susceptible a sufrir mutaciones, considerando la repetición de un evento mutagénico muy similar en la misma región del gen, durante experimentos independientes y en cepas diferentes. Estos hechos corroboran la pertinencia de evaluar la funcionalidad de ToxR en cepas de *V. cholerae* que se manipulan en el laboratorio y que pretenden ser empleadas como IFA de determinada vacuna. El análisis del patrón de proteínas de membrana externa podría implementarse como una herramienta

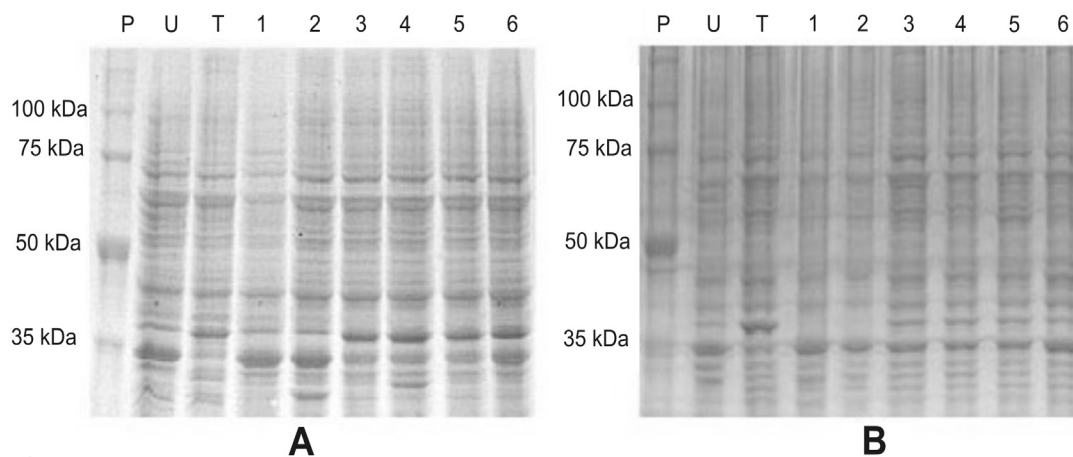


Fig. 1. Análisis de la expresión de proteínas de superficie por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Las cepas se cultivaron en medio LB (gel A) y medio AKI (gel B). U) C7258, control positivo de OmpU. T) 638, control positivo de OmpT. 1) CRC266. 2) CRC13. 3) CRC132. 4) CRC3222. 5) CRC3223. 6) CRC3241. P) patrón de peso molecular empleado fue el Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega).

C7258	MFGLGHNSKEISMISHIGTKFILAEKFTFDPLSNTLIDKEDSEEIIRLGSN
CRC13	MFGLGHNSKEISMISHIGTKFILAEKFTFDPLSNTLIDKEDSEEIIRLGSN
CRC132	MFGLGHNSKEISMISHIGTKFILAEKFTFDPLSNTLIDKEDSEEIIRLGSN
CRC134	MFGLGHNSKEISMISHIGTKFILAEKFTFDPLSNTLIDKEDSEEIIRLGSN
C7258	ESRILWLLAQRPNVEISRNDLHDFVWREQGFEVDDSSLTQAISTLRKMLK
CRC13	ESRILWLLAQRPNVEISRNDLHDFVWREQGFEVDDSSLTQAISTLRKMLK
CRC132	ESRILWLLAQRPNVEISRNDLHDFVWREQGFEVDDSSLTQAISTLRKMLK
CRC134	ESRILWLLAQRPNVEISRNDLHDFVWREQGFEVDDSSLTQAISTLRKMLK
C7258	DSTKSPQYVKTVPKRGYQLIARVETVEEEMARESEAAHDISQPESVNEYA
CRC13	DSTKSPQYVKTVPKRGYQLIARVETVEEEMARESEAAHDISQPESVNEYA
CRC132	DSTKSPQYVKTVPKRGYQLIARVETVEEEMARESEAAHDISQPESVNEYA
CRC134	DSTKSP TIRQNGSETRLPIDRPSGNG*
C7258	ESSVVPSSATVVNTPQPANVVTNKSAPNLGNRLLLIL
CRC13	ESSVVPSSATVVNTPQPANVVTNKSAPNLGNRLLLIL
CRC132	ESSVVPSSATVVNTPQPANVVTNKSAPNLGNRLLLIL

Fig. 2. Alineamiento de las secuencias proteicas de *ToxR*. Análisis de la secuencia hipotética de los dominios citoplasmático y de transmembrana de *ToxR* (186 aminoácidos), deducida a partir de la secuencia del gen correspondiente, de las cepas de *V. cholerae* C7258, CRC13, CRC132 y CRC134. Sombreada en gris aparece la región de 106 aminoácidos que guarda homología en todas las cepas. En cursiva se representa la región no homóloga de 20 aminoácidos, que se forma luego del corrimiento del marco de lectura. El asterisco marca la proteína truncada.

para identificar una alteración en la funcionalidad del regulador *ToxR*, antes de analizar la capacidad colonizadora de una posible cepa vacunal en un modelo animal.

Al igual que otros activadores localizados en membrana, *ToxR* posee una estructura bitópica, con un dominio amino terminal citoplasmático y un terminal carboxílico periplasmático, separados por un pequeño fragmento transmembranoso.¹⁸ Existen estudios que demuestran que las funciones reguladoras de *ToxR*, tanto sobre la expresión de las porinas *OmpU* y *OmpT* como sobre el promotor de *toxT*, residen en los dominios citoplasmático y transmembranoso, y que la localización en membrana de esta proteína es suficiente para la ejecución de estas funciones, independientemente de la naturaleza del dominio periplasmático e incluso en ausencia de este.¹⁹⁻²¹ El análisis de la secuencia del gen *toxR* de CRC132 y su comparación con las de las cepas CRC13 y C7258 permite concluir que la alteración del patrón de proteínas de membrana externa de CRC132 no está relacionada con ninguna mutación en la región codificadora de los dominios citoplasmático y transmembranoso del gen *toxR* de esta cepa, correspondiente al fragmento de 763 pb secuenciado. No obstante, no se puede descartar que exista algún cambio en la región promotora de *toxR* que pueda afectar los niveles de expresión de la proteína que codifica, lo cual pudiera explicar la ausencia de represión total de *ompT* en las condiciones estudiadas. Tampoco pueden obviarse mutaciones en otros genes, descritos o no, que afecten los niveles de expresión o la estabilidad de *ToxR* e incluso la regulación de los genes *ompT* y *ompU*.

El cultivo en medio AKI permite la expresión de la toxina colérica y otros genes relacionados con la virulencia que están directa o indirectamente regulados por *ToxR*.²² Varios estudios han correlacionado los patrones de expresión en medio AKI de estos genes con lo que se ha observado en las condiciones del intestino humano, aunque también se han reportado diferencias en el control del regulón *ToxR*, bajo condiciones *in vivo* e *in*

vitro.^{23,24} Al crecer la cepa CRC132 y los mutantes $\Delta mshA$ en medio AKI, se redujo la expresión de *OmpT* en relación con el medio LB, aunque se mantuvieron niveles detectables de esta porina por la técnica de SDS-PAGE (Fig. 1B). Luego, el patrón de proteínas de membrana externa de las cepas cultivadas en medio AKI, se asemeja más al que muestran las cepas que poseen el fenotipo salvaje: CRC266, CRC13 y C7258. Este hecho corrobora los resultados de otros experimentos que evalúan el desempeño de los mutantes en modelos *in vivo*, ya que tanto CRC132 como los mutantes $\Delta mshA$ CRC3222, CRC3223 y CRC3241 colonizan adecuadamente el intestino del ratón neonato y son capaces de infectarse con CTX ϕ al emplear este modelo *in vivo*.¹⁷

De los resultados, se pudo concluir que la alteración de la funcionalidad de *ToxR*, detectada a través de los cambios en el patrón de las proteínas *OmpT* y *OmpU* entre las cepas CRC3222, CRC3223 y CRC3241 con respecto a su parental atoxigénico CRC13, se manifiesta en las condiciones de cultivo *in vitro*, pero no afecta el desempeño de estos mutantes en modelos animales. La naturaleza de dicha alteración deberá estudiarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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):237-243.
- Waldon MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996;272(5270):910-914.
- 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.
- Peterson KM, Mekalanos JJ. Characterization of the *Vibrio cholerae* *ToxR* regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. Infect Immun. 1988;56(11):2822-2829.

5. Matson JS, Withey JH, DiRita VJ. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun*. 2007;75(12):5542-5549.
6. Beck NA, Krukons ES, DiRita VJ. TcpH influences virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by inhibiting degradation of the transcription activator TcpP. *J Bacteriol*. 2004;186(24):8309-8316.
7. Crawford JA, Kaper JB, Dirita VJ. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 1998;29(1):235-246.
8. Li CC, Crawford JA, Dirita VJ, Kaper JB. Molecular cloning and transcriptional regulation of ompT, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2000;35(1):189-203.
9. Provenzano D, Klose KE. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10220-10224.
10. Carroll PA, Tashima KT, Rogers MB, Dirita VJ, Calderwood SB. Phase variation in tcpH modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 1997;25(6):1099-1111.
11. Fando R. Obtención, caracterización y evaluación de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para fines vacunales. [Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias Biológicas]. Ciudad de la Habana, Universidad de la Habana, julio de 2004.
12. Ottemann KM, Dirita VJ, Mekalanos JJ. ToxR proteins with substitutions in residues conserved with OmpR fail to activate transcription from the cholera toxin promoter. *J Bacteriol*. 1992;174(21):6807-6814.
13. Ledón T, Ferrán B, Pérez C, Campos J, Fando R. Susceptibilidad de mutantes atoxigénicos de *Vibrio cholerae* O139 a la infección con los bacteriófagos CTXphi y VGJphi. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2010;41(1).
14. Miller VL, Taylor RK, Mekalanos JJ. Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*. 1987;48(2):271-279.
15. Kolmar H, Hennecke F, Gotze K, Janzer B, Vogt B, Mayer F *et al*. Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J*. 1995;14(16):3895-3904.
16. Dziejman M, Kolmar H, Fritz HJ, Mekalanos JJ. ToxR cooperative interactions are not modulated by environmental conditions or periplasmic domain conformation. *Mol Microbiol*. 1999;31(1):305-317.
17. Crawford JA, Krukons ES, Dirita VJ. Membrane localization of the ToxR winged-helix domain is required for TcpP-mediated virulence gene activation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003;47(5):1459-1473.
18. Iwanaga M, Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J Clin Microbiol*. 1985;22(3):405-408.
19. Lee SH, Hava DL, Waldor MK, Camilli A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*. 1999;99(6):625-634.
20. Lee SH, Butler SM, Camilli A. Selection for *in vivo* regulators of bacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(12):6889-6894.