

Construcción de mutantes de *Vibrio cholerae* auxótrofos a lisina con propósitos vacunales

Edith Suzarte, Karen Marrero, Javier Campos, Talena Ledón, Boris L. Rodríguez, Eriel Martínez, Arlenis Moreno y Rafael Fando.

Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 12 de octubre de 2002. Aceptado: 5 de diciembre de 2002.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, mutantes auxótrofos, lisina, vacuna de cólera.
Key words: *Vibrio cholerae*, mutants auxotrophs, lysine, cholera vaccine.

RESUMEN. Cólera, la enfermedad diarreica aguda causada por *Vibrio cholerae* O1 y O139 continúa produciendo brotes endémicos y epidémicos en muchas partes del mundo, principalmente, en países pobres. Las investigaciones más promisorias hasta el momento para obtener una vacuna eficaz contra esta enfermedad se han centrado en la obtención de cepas de *V. cholerae* vivas atenuadas para ser usadas como vacunas orales. El comportamiento de estas cepas genéticamente modificadas en el ambiente al ser liberadas durante campañas de vacunación, es impredecible. Se sabe que potencialmente pueden adquirir genes de virulencia mediante el mecanismo de transferencia genética horizontal con otros microorganismos. Con el objetivo de disminuir la probabilidad de ocurrencia de este evento genético no deseado este trabajo describe la construcción de nuevos candidatos vacunales con capacidad disminuida para proliferar en el ambiente. La estrategia que se siguió fue la introducción de una mutación definida en el gen *lysA* en el candidato vacunal de *V. cholerae* 1333. Este gen codifica para la diaminopimelato descarboxilasa, enzima que cataliza el último paso de la vía biosintética de la lisina y por tanto, las cepas mutadas obtenidas son auxótrofos a lisina y poseen una capacidad disminuida para proliferar en condiciones deficientes de este aminoácido. Uno de los mutantes, 1333L2-2, se caracterizó en cuanto a su morfología, motilidad, crecimiento *in vitro* y colonización en el modelo de cólera del ratón lactante mostrando características similares a su cepa parental.

ABSTRACT. Cholera is an acute diarrheal disease caused by the serogroups O1 and O139 of the enteropathogenic bacterium *Vibrio cholerae* that continuously causing epidemic outbreaks in many underdeveloped countries where this disease is endemic. The most promising strategy for developing an effective cholera vaccine has focused in the use of *V. cholerae* live attenuated strains as oral vaccines. The behavior of these genetically modified strains in the environment during vaccination campaigns is unpredictable. Therefore, there is the risk of acquisition of virulent genes through horizontal gene transfer mechanisms mediated by other microorganisms. In order to decrease the chance of occurrence of these undesired genetic events this work describes the construction of new vaccine strain candidates with diminished capacity to proliferate in the environment. The new strains were generated by introducing a defined mutation in the *lysA* gene of the previously obtained *V. cholerae* vaccine strain candidate 1333. This gene encodes the enzyme diaminopimelate descarboxylase, which catalyzes the last step in the lysine biosynthetic pathway. The resultant mutant strains are lysine auxotrophs and for that reason they have diminished capacity to proliferate in lysine-deficient conditions. One of the mutants, 1333L2-2, was compared with its parental strain 1333 regarding morphology, *in vitro* growing rate, motility and colonization in the infant mouse cholera model and these features were similar in both strains.

INTRODUCCION

El cólera es una de las enfermedades diarreicas epidémicas más severas que afecta a los países subdesarrollados en los que presenta elevados niveles de morbilidad y mortalidad. El agente causal de la enfermedad es *Vibrio cholerae*, siendo los serogrupos O1 y O139 los responsables de las siete pandemias ocurridas hasta el momento.

La patogénesis del cólera involucra la ingestión oral de comida y agua contaminada, el paso del microorganismo a través de la barrera ácida del estómago y la colonización en la región proximal del intestino donde es liberada la toxina colérica responsable de un desbalance electro-lítico que causa una diarrea severa.¹

Se han desarrollado varios prototipos vacunales contra el cólera, siendo las vacunas vivas atenuadas suministradas por vía oral la variante más promisorias hasta el momento luego de demostrarse que la infección clínica con *Vibrio cholerae* estimulaba una respuesta inmune eficaz y de larga duración.²

La cepa *Vibrio cholerae* 1333 obtenida en el laboratorio de Genética del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, es una de las cepas atenuadas que ha resultado bien tolerada e inmunogénica en humanos. Esta cepa derivada de la cepa El Tor Inaba C6706 fue obtenida por delección del casete de virulencia CTX y la introducción en el locus de la hemaglutinina proteasa (*hap*) de un gen marcador, *celA*, que codifica

para al enzima endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum*, procedimiento similar al empleado para obtener el candidato vacunal de *V. cholerae* Ogawa 638.^{3,4}

Aún cuando las vacunas vivas parecen ser los candidatos más promisorios para la obtención de una vacuna eficaz contra el cólera tienen el inconveniente de que al ser liberadas al ambiente potencialmente pueden readquirir genes de virulencia por mecanismos de transferencia genética horizontal con otros microorganismos. Por este motivo, se han buscado fórmulas para disminuir la proliferación de las cepas atenuadas en el ambiente luego del proceso de vacunación.

Este trabajo se propuso obtener y caracterizar los mutantes derivados del candidato vacunal 1333 auxótrofos a la lisina, mediante la inactivación del gen *lysA* con el fin de disminuir su capacidad proliferativa en condiciones deficientes de este aminoácido. *LysA* codifica para la diaminopimelato descarboxilasa, enzima que cataliza el último paso de la vía biosintética de la lisina

MATERIALES Y METODOS

Cepas, plasmidios y medios de cultivo utilizados

La tabla 1 muestra las cepas bacterianas y plasmidios utilizados en este trabajo junto a sus características más importantes.

Los medios de cultivo utilizados fueron: LB; medio mínimo M9G (Na_2HPO_4 , 0,6 %, KH_2PO_4 0,3 %, NaCl 0,05 %, NH_4Cl 0,1 % y glucosa 0,2 %), medio syncase mínimo (Na_2HPO_4 0,5 %, K_2HPO_4 0,5 %, sacarosa 0,5 % y NH_4Cl 0,118 %) y medio LBSacarosa (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0,5 %, sacarosa, 15 %). En el medio sólido se utilizó agar al 1,5 %, excepto para LB agar suave en el que se usó al 0,3 %.

Cuando fue necesario, a los medios se les añadieron antibióticos a las concentraciones siguientes: ampicilina (Amp) a 100 $\mu\text{g/mL}$, kanamicina (Km) a 100 $\mu\text{g/mL}$ y polimixina B (P) a 100 U/mL y en el caso de la lisina se utilizó a una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$.

Técnicas usadas en el trabajo con el ADN

El aislamiento de ADN genómico de *Vibrio cholerae* se realizó según el método de Ausubel y col.⁹ y la purificación de ADN plasmídico mediante el Sistema Wizard® Plus Midipreps DNA purification System de Promega.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plasmidios utilizados.

Cepas	Características
<i>E. coli</i>	
SM10 λ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE recA</i> RP4-2Tc::Mu λ pir; Km ^r . Hospedero para vectores suicidas con funciones de transferencia integradas en el cromosoma. ⁵
JM109	<i>recA supE44 endA hsdR7 gyrA96 relA thi</i> Δ (<i>lac proAB</i>). (Promega).
<i>V. cholerae</i>	
S12CMY12	Cepa O1, El Tor, Ogawa Δ (<i>cep orfU ace zot ctxA ctxB</i>) <i>hap::celA</i> , Δ <i>asd</i> .
JM13H12	Mutante auxótrofo a lisina derivado de S12CMY12 obtenido en este trabajo.
C6706	Cepa O1, El Tor, Inaba, aislada en Perú en 1991.
1333	Derivado de C6706 Δ (<i>cep orfU ace zot ctxA ctxB</i>) <i>hap::celA</i> .
1333L2-2	1333 Δ <i>lysA</i> (este trabajo).
Plasmidios	
PUTKm2	Plasmidio suicida Amp ^r , Km ^r . ⁶
pCVD442	Vector suicida Amp ^r y contiene además el gen <i>sacB</i> , como marcador de contraselección. ⁵
pUC19	Vector para clonación, Amp ^r . ⁷
pCVJM	Derivado del pCVD442 con el fragmento <i>Bgl</i> II del ADN cromosómico del mutante JM13H12 adyacente a la inserción del minitrn5Km2. (este trabajo)
pUJM	Derivado del pUC19 con el inserto proveniente del pCVJM que contiene el flaqueante al transposón minitrn5Km. (este trabajo)
pUJM Δ <i>lysA</i>	Derivado del pUJM con una delección <i>AccI/PstI</i> en el gen <i>lysA</i> . (este trabajo)
pCV Δ <i>lysA</i>	Derivado del pCVD442 con el fragmento <i>SphI-SmaI</i> del pUJM Δ <i>lysA</i> que contiene al gen <i>lysA</i> mutado.
pGEM® T vector	Vector derivado del pGEM® 5Zf(+) utilizado para la clonación de productos de PCR con adenina en los extremos, Amp ^r . ⁸
pGlysA2	Derivado del pGEM® T Vector con el gen <i>lysA</i> amplificado por PCR clonado en la dirección contraria al gen <i>lacZ</i> en el pGEM®-5Zf(+) (este trabajo)
pGlysA3	Derivado del pGEM® T Vector con el gen <i>lysA</i> amplificado por PCR clonado en la misma dirección del gen <i>lacZ</i> en el pGEM®-5Zf(+) (este trabajo)

La separación del ADN en geles de agarosa fue hecha según Sambrook y col.¹⁰ y la purificación de fragmentos de ADN a partir de ellos, se realizó utilizando el sistema GFX™ PCR DNA and gel Band Purification de Amersham Pharmacia Biotech.

La secuenciación del ADN se hizo utilizando el método de Sanger,¹¹ con el sistema T7 sequenase_{v2.0} 7-deaza-dGTP suministrado por Amersham. Para la secuenciación del fragmento flaqueante a la inserción del minitransposón se utilizaron los cebadores universales del pUC19, cebador directo (-40) y cebador reverso (-21) y para la secuenciación de los clones pUJM Δ *lysA* se sintetizó un oligonucleótido de 16 pares de bases con la secuencia siguiente: 5'-GCAAGGTGGTATTC-TC-3'. Este oligo hibrida con una

secuencia interna del gen *lysA* clonado en el pUJM situada a 83 pb del sitio donde se le realizaron las modificaciones para la obtención del pUJM Δ *lysA*.

La secuencia nucleotídica obtenida fue comparada con la secuencia de ADN cromosómico de *Vibrio cholerae* N16961 que se encuentra depositada en el Instituto de Investigaciones del Genoma (TIGR), EE.UU. Para el análisis de la secuencia se utilizaron los programas Clone versión 3.11 y Gene Runner version 3.02.

La técnica de hibridación Southern blot se realizó según Sambrook y col.¹⁰ Las muestras de ADN, digeridas previamente con diferentes enzimas, fueron corridas en un gel de agarosa al 1,0 %, transferidas a una membrana de nylon del tipo Hy-

bond-N siguiendo un procedimiento de transferencia alcalina por capilaridad descendente.¹² La detección se realizó con el sistema no radioactivo para digoxigenina (DIG) de Böehringer Mannheim.

La transformación bacteriana se realizó mediante electroporación, según Dower y col.,¹³ y en el caso de *V. cholerae* se siguió el mismo procedimiento con ligeras modificaciones: las células fueron lavadas tres veces con una disolución amortiguadora (SEB) que contenía 0,27 mol/L de sacarosa, 0,013 mol/L de Na_2HPO_4 y 0,001 mol/L de MgCl_2 y finalmente resuspendidas en un volumen adecuado de la misma disolución.¹⁴

Generación de una librería de inserciones del miniTn5-Km2 en *V. cholerae* S12CMY12 y selección de un mutante auxótrofo a la lisina

La mutagénesis con el transposón fue llevada a cabo mediante conjugación.⁶ La cepa donadora *E. coli* SM10 λ pir transformada con el pUTKm2 se puso en contacto con la cepa receptora *V. cholerae* S12CMY12 en una placa de LB durante 4 h a 37 °C. La mezcla de conjugación se extendió en placas de M9G suplementadas con Km, P y lisina. Las colonias resultantes se replicaron

hacia placas de LBPKm y LBPAmpKm. Los clones resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina se seleccionaron considerando que en su genoma se había insertado una copia del transposón sin el plasmidio acompañante. La búsqueda de auxótrofos a la lisina se realizó mediante siembra paralela en placas de M9G sin suplemento aminoacídico y en placas de M9G con suplemento de lisina.

Clonación del fragmento de ADN cromosomal flanqueante a la inserción del minitn5Km2

El ADN cromosomal del mutante auxótrofo a la lisina JM13H12 se digirió con *Bgl*II y se ligó con el vector pCVD442 igualmente digerido. Células bacterianas de *E. coli* SM10 λ pir se transformaron por electroporación con la reacción de ligamiento. Los clones recombinantes se seleccionaron en placas de LBampKm. Un clon con el inserto correcto se caracterizó por restricción y se denominó pCVJM (Fig. 1A). Este plasmidio fue posteriormente digerido *Bgl*II/*Sph*I y el fragmento que contenía el flanqueante a la inserción del minitransposón se clonó en pUC19 digerido con *Bam*HI y *Sph*I dando lugar al plasmidio

pUJM (Fig. 1B), lo que facilitó su secuenciación con los cebadores universales de pUC19.

Construcción de los plasmidios pUJM Δ lysA y pCV Δ lysA

El gen *lysA* en pUJM se inactivó *in vitro* a través de la eliminación de un fragmento interno para obtener el alelo Δ lysA. Se trató de mantener el marco abierto de lectura para lo cual, el plasmidio pUJM se digirió con las enzimas *Acc*I y *Pst*I, eliminándose una región de 106 pb del gen *lysA*. Luego de un tratamiento con T4 ADN polimerasa y religamiento en presencia de fragmentos de ocho pares de bases (pb) con un sitio *Pst*I interno, la mezcla de ligamiento se transformó en células de JM109. Se secuenciaron tres de los clones recombinantes obtenidos y el clon que poseía las modificaciones esperadas se denominó pUJM Δ lysA (Fig. 1C). Este plasmidio fue digerido posteriormente con las enzimas *Sph*I y *Sma*I, y la banda que contiene el alelo Δ lysA ligada con el vector pCVD442 igualmente digerido. La mezcla de ligamiento se transformó en células de SM10 λ pir luego de lo cual, un clon apropiado fue seleccionado y nombrado pCV Δ lysA (Fig. 1D).

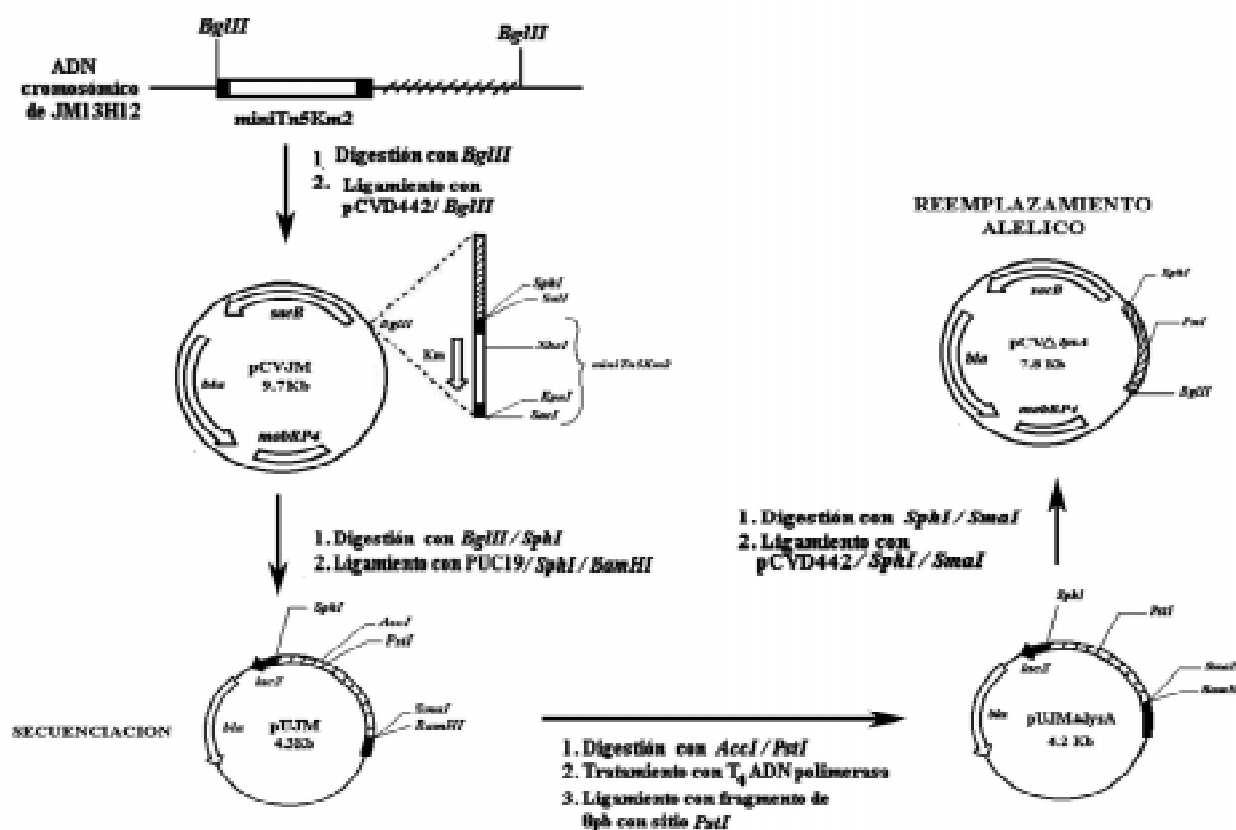


Fig. 1. Estrategia de construcción del plasmidio suicida pCV Δ lysA. Aparece rayada la secuencia de ADN de la cepa JM13H12 que flanquea por el lado derecho a la inserción del minitn5Km2, el cual se representa a su vez flanqueado por las secuencias de inserción en negro. Se muestran los sitios de restricción de las enzimas relevantes en el proceso de clonación.

Construcción de un mutante molecularmente definido de la cepa de *Vibrio cholerae* 1333 con auxotrofia a la lisina

La construcción de un mutante molecularmente definido con la síntesis de una diaminopimelato descarboxilasa (LysA) inactiva se realizó mediante reemplazamiento alélico del gen *lysA* en el cromosoma de la cepa *V. cholerae* 1333 con el alelo mutado del vector suicida pCVΔ*lysA*. Primeramente, este plasmidio se introdujo en *Vibrio cholerae* 1333 mediante conjugación, incubando una mezcla de la cepa donadora y la aceptora (1:1) en medio LB durante 4 h a 37 °C. Los transformantes resultantes se seleccionaron en placas de LBpAmp. El sitio de integración del pCVΔ*lysA* se analizó mediante Southern blot. Los cointegrados correctos se cultivaron en caldos LB sin presión selectiva de antibióticos, y se extendieron en placas de LB sacarosa. Las colonias resultantes se replicaron a placas de M9G y M9G con suplemento de lisina para seleccionar los clones que poseían auxotrofia a este aminoácido. Los segregantes correctos se identificaron por Southern blot.

Características del crecimiento y observación morfológica de los mutantes auxótrofos a la lisina

Para analizar el crecimiento de los mutantes auxótrofos a la lisina se determinó el tiempo de duplicación de la cepa en un medio rico en nutrientes (LB) y en un medio mínimo (syncase con suplemento de lisina). En ambos casos, se inoculó $1 \cdot 10^7$ células/mL en *erlenmeyers* con 50 mL del caldo. La densidad óptica (DO) a 600 nm fue determinada cada 20 min hasta que se alcanzó la fase estacionaria.

Muestras de la fase exponencial y de la fase estacionaria de los cultivos fueron observadas al microscopio óptico para analizar la morfología de los mutantes.

Ensayo de colonización de los mutantes en el modelo de ratón lactante

Grupos de cinco ratones BalB/c de 3 a 5 d de nacidos, separados de sus madres 4 h antes, se inocularon intragástricamente con 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de cada cepa de *V. cholerae*. Las células para el inóculo se crecieron en 5 mL de caldo LB a 37 °C hasta una DO de 1,0 a 600 nm, partiendo de colonias de placas frescas. Los títulos bacterianos en cada inóculo se

determinaron extendiendo diluciones seriadas de él en placas de LB.

Los ratones inoculados se incubaron a temperatura ambiente en ausencia de sus madres toda la noche. Al cabo de 24 h fueron sacrificados, se les extrajo el intestino delgado, que fue lavado dos veces con PBS y homogenizado en 5 mL de esta solución amortiguadora. Diluciones seriadas de cada homogenado se extendieron en placas de LBP para evaluar la colonización.

Complementación del mutante de *V. cholerae* 1333L2-2

Con el objetivo de complementar al mutante *V. cholerae* 1333L2-2 se amplificó el gen *lysA* de *V. cholerae* 1333 a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se diseñaron dos oligos que fueron sintetizados por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana. La secuencias de los oligonucleótidos cuesta arriba y abajo del gen *lysA* son: 5'-GTAAATCACGC-TACTAAG-3' y 5'-AGAAAAATGG-AAATGC-3', respectivamente. Estos oligos amplifican la región codificadora del gen *lysA* y 30 pares de bases que pertenecen a la región intergénica que se encuentra entre *lysA* y el gen precedente.

La banda obtenida como resultado de la reacción de PCR se clonó en el vector pGEM® T Vector obteniéndose el plasmidio pGlysA3 que posee el gen *lysA* clonado en la misma dirección que el gen *lacZ*. La cepa de *V. cholerae* 1333L2-2 se transformó por electroporación con pGlysA3 y se seleccionaron los transformantes en placas de LBpAmp. Las colonias obtenidas se replicaron hacia placas de syncaseAmp y de este con suplemento de lisina y se incubaron toda la noche a 37 °C.

Ensayo de motilidad

Colonias aisladas de una placa fresca de LB se inocularon por inserción (2 a 3 mm) en una placa de LB agar suave. El diámetro de cada colonia expandida en el agar suave se midió al cabo de 24 h de incubación a 30 °C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Generación de una librería de inserciones del miniTn5-km2 en *Vibrio cholerae* S12CMY12 y selección de un mutante auxótrofo a la lisina

La librería de inserciones generada con el minitransposón mini-Tn5Km2, contenido en el plasmidio pUTKm2, en el genoma de la cepa

de *Vibrio cholerae* S12CMY12 originó cerca de 2 500 clones. El 50 % de estos constituyó el resultado de la integración del plasmidio pUTKm2 en el ADN cromosómico de S12CMY12, mientras que el otro 50 % correspondió únicamente a la transposición del elemento de inserción. De estos últimos clones, se seleccionó un mutante auxótrofo a la lisina que fue denominado JM13H12.

Características del crecimiento de JM13H12, observación morfológica y colonización en el modelo de ratón lactante

La cepa JM13H12 al contener en su genoma un gen de resistencia a antibiótico (Km) no es útil como cepa vacunal. A pesar de esto, el mutante se sometió a un análisis de su velocidad de crecimiento, morfología y niveles de colonización comparada con la cepa parental para determinar si la mutación debida a la inserción del transposón resultaba en algún efecto negativo sobre cualesquiera de estas características que imposibilitara más tarde la obtención de una cepa vacunal con una mutación definida en el mismo gen afectado por la inserción del transposón.

Se determinaron los tiempos de duplicación del mutante JM13H12 y de su cepa parental en medio LB. Para el primero resultó de 24,39 min mientras que para la cepa parental fue de 20,89 min. Los resultados evidenciaron que la inserción del transposón en el mutante no afectó drásticamente la velocidad de crecimiento que resultó similar a la de la cepa parental.

Morfológicamente no se observaron diferencias significativas en cuanto a la forma de coma, el largo o grosor bacteriano entre la cepa mutante y la parental, por lo que se pudo afirmar que la inserción del transposón no generó cambios de morfología detectables al microscopio óptico.

Estos resultados indicaron la factibilidad de continuar el trabajo de obtención de un mutante auxótrofo a lisina en *Vibrio cholerae* con propósitos vacunales.

Análisis del ADN cromosómico de JM13H12 por Southern blot

La hibridación Southern blot se utilizó para determinar el número de inserciones del transposón presentes en el genoma de JM13H12 y además caracterizar, según los sitios de restricción al fragmento que contenía la inserción del miniTn5Km2. Se usó como sonda al fragmento de ADN que contiene al gen de resis-

tencia a la kanamicina del mini-Tn5Km2 (fragmento *EcoRI*).

Se utilizaron enzimas de restricción que no poseían sitios de corte dentro del módulo de inserción del minitransposón como: *DraI*, *NcoI* y *NdeI*. Además, fue utilizada la enzima *BglII* que corta en el extremo I del miniTn5Km2.

Todas las enzimas ensayadas generaron una única banda, lo que evidencio que solo se produjo una inserción del transposón en el genoma de JM13H12 (Fig. 2). La banda obtenida con *BglII* fue la de menor tamaño y midió aproximadamente 3,5 kb de los cuales 1,8 kb pertenecen al minitransposon y el resto (1,7 kb) al flanqueante derecho del miniTn5Km2. Las demás digestiones ensayadas produjeron una banda mayor de 5,4 kb.

Clonación del fragmento de ADN cromosomal de JM13H12 que contiene la inserción del miniTn5Km2

Se seleccionó la enzima *BglII* para clonar el fragmento de ADN cromosomal de JM13H12 que contiene la inserción del minitransposón por ser esta enzima la que originaba la banda de menor tamaño. Siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos se obtuvo el plasmidio pCVJM (Fig. 1A).

Se determinó la orientación del fragmento clonado por análisis por restricción y se caracterizó el flanqueante al transposón en cuanto a la presencia o no de sitios para las enzimas siguientes: *BglII*, *SalI*, *EcoRI*, *DraI*, *XhoI*, *KpnI*, *SphI* y *SacI*.

La digestión doble *XhoI/EcoRI* de pCVJM reveló la orientación del fragmento clonado generando tres ban-

das, de 5, 3 y 1,2 kb, lo que se correspondió con la existencia de dos sitios de corte de la enzima *EcoRI* en el vector, en el sitio múltiple de clonación y en el gen *sacB*, y un sitio de restricción para *XhoI* en el gen que confiere resistencia a kanamicina presente en el minitransposón.

En las digestiones del pCVJM con *SalI*, *EcoRI*, *SphI*, *KpnI* y *SacI* se obtuvieron las bandas esperadas teniendo en cuenta los sitios de corte de estas enzimas en el vector de clonación y en el miniTn5Km2. En ninguno de los casos aparecieron bandas adicionales lo que reveló la ausencia de sitios de corte para estas enzimas en la región clonada adyacente al transposón.

Secuenciación del fragmento flanqueante al miniTn5Km2

Se secuenciaron 431 nucleótidos del pUJM, de los cuales, 35 pertenecen al extremo O del miniTn5Km2 y 29 al sitio múltiple de clonación del pUC19. La secuencia restante que pertenece al genoma de JM13H12 fue comparada con la secuencia de la cepa de *Vibrio cholerae* N16961 depositada en la base de datos del Instituto de Investigaciones del Genoma (TIGR). Se encontró que la secuencia correspondiente al fragmento adyacente al transposón tenía homología con el gen *lysA* y el otro extremo de la secuencia clonada poseía homología con el gen *dapF*. El primero se halla localizado en el cromosoma mayor de *Vibrio cholerae* (VCO125), con una longitud de 1,25 kb. Este gen codifica para la enzima diaminopimelato descarboxilasa, encargada de catalizar el último paso de la vía de biosíntesis de la lisina.¹⁵

El gen *dapF* (VCO126) se encuentra a continuación de *lysA* con un tamaño de 870 pb. Su secuencia codifica para la enzima diaminopimelato epimerasa que también forma parte de la ruta biosintética de la lisina, donde cataliza la reacción de formación del mesodiaminopimelato, que constituye el sustrato de la diaminopimelato descarboxilasa además de ser un compuesto esencial del peptidoglicano en las bacterias Gram-negativas.¹⁶

Ambos genes se encuentran sobrelapados y en la misma orientación según indica el TIGR.

La inserción del miniTn5Km2 en el gen *lysA* parece ser el responsable de la auxotrofia a la lisina encontrada en la cepa JM13H12. Resultados semejantes se informaron para *E. coli* donde cepas mutadas en

el gen *lysA* muestran una auxotrofia a la lisina.¹⁷

Construcción de un mutante de *Vibrio cholerae* 1333 molecularmente definido con auxotrofia a la lisina

Teniendo en cuenta que la mutación del gen *lysA* genera auxotrofia a la lisina, se diseñó una estrategia para construir un mutante de la cepa de *V. cholerae* 1333 que mostrara la síntesis de una diaminopimelato descarboxilasa inactiva para dar origen a un candidato vacunal con capacidad proliferativa disminuida en condiciones deficientes de lisina.

Primeramente, se construyó el plásmido pUJMΔ*lysA* (ver materiales y métodos) que contiene un fragmento del gen *lysA* interrumpido por una delección de 106 pares de bases donde se adicionó además un fragmento de 8 pb con sitio *PstI*, con el objetivo de mantener el marco abierto de lectura original y evitar las posibles afectaciones de efectos polares. Se seleccionaron tres de los clones recombinantes obtenidos utilizando como criterio un chequeo por restricción con las enzimas *PstI* y *HincII* que resultara en un único sitio de corte con *PstI*, el cual debía corresponderse a la presencia del fragmento de 8 pb adicionado y una banda de menor tamaño que el plasmidio original linealizado en el caso de la enzima *HincII*, lo que corrobora la ocurrencia de la delección. Aún así quedaba la incertidumbre de que se hubiesen incertado varios fragmentos de 8 pb uno a continuación del otro, por lo cual, se decidió la secuenciación de estos clones para verificar la correcta introducción de las modificaciones realizadas.

Las secuencias obtenidas revelaron que el clon 5 era el único que poseía un solo fragmento de 8 pb con sitio *PstI* adicionado a diferencia del resto (Fig. 3) por lo cual, fue seleccionado para la obtención posterior del plasmidio pCVΔ*lysA* tal como fue descrito (Fig. 1). Este vector suicida se introdujo en *V. cholerae* 1333 mediante conjugación generando un grupo de cointegrantes como resultado de un primer evento de recombinación homóloga entre los fragmentos adyacentes a la delección en el plasmidio y los fragmentos homólogos en el cromosoma de la cepa. La técnica de *Southern blot* permitió conocer la estructura génica de los cointegrantes. Para ello el ADN cromosomal (ADNc) de los diferentes cointegrantes se digirió con la enzima de restricción *XhoI* que posee

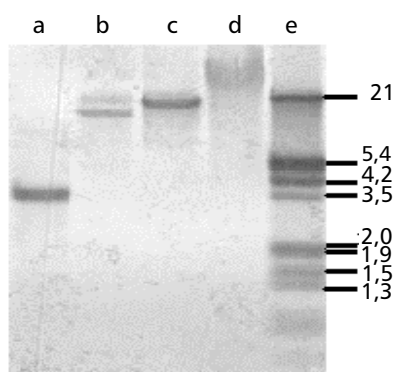


Fig. 2. Análisis del mutante de *V. cholerae* JM13H12 por Southern blot. El ADN de JM13H12 fue digerido con diferentes enzimas. El carril **a** corresponde a la digestión con *BglII*, el **b**, a la digestión con *DraI*; el **c** a la digestión con *NcoI*; el **d** a la digestión con *NdeI* y el **e** al marcador de peso molecular ADN de fago λ digerido con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*.

dos sitios de corte en el genoma de *V. cholerae* exteriores a los genes *lysA*/*dapF*. La digestión con *Xho*I produce una banda de 5,2 kb en la cepa tipo salvaje y una banda de 12,5 kb en los cointegrantes correctos correspondientes a la inserción del plasmidio en el gen *lysA* del cromosoma de la cepa (Fig. 4).

Como resultado del proceso de segregación de los cointegrantes correctos, se seleccionaron cinco clones que mostraron auxotrofia a la lisina en syncase mínimo, para identificar por *Southern blot* que en efecto la auxotrofia de este aminoácido se debía a la presencia del gen mutado en sus genomas.

Con este fin, el ADNc de los segregantes y la cepa parental se digirió con las enzimas *Bgl*II y *Pst*I, cuyos sitios de restricción se sitúan en el interior del gen *dapF* y en el octámero añadido para mantener el marco de lectura original respectivamente. Como resultado de esta digestión, se esperaban: dos bandas de 2,1 y 1,1 kb para los segregantes que poseían el gen *lysA* mutado en su genoma y dos bandas de 2,1 kb y 1,2 kb en la cepa parental.

Todos los segregantes con auxotrofia a la lisina contenían la delección en el gen *lysA* (Fig. 4). Para ensayos posteriores fue seleccionado el segregante 1333L2-2.

Complementación del mutante definido de *V. cholerae* 1333L2-2 auxótrofo a la lisina

Con el objetivo de determinar si la auxotrofia a la lisina manifestada por los mutantes se debía únicamente a la presencia del gen *lysA* mutado, la copia intacta del gen presente en el plasmidio pGlysA3 fue provista en *trans* al mutante 1333L2-2 para analizar si era capaz de crecer en medio mínimo sin lisina. Se obtuvo crecimiento en ausencia de lisina en el mutante transformado con el plasmidio pGlysA3 y no así, en el caso de 1333L2-2 sin transformar, usado como control, por lo que pGlysA3 fue capaz de complementar la mutación en el gen *lysA* y por tanto la auxotrofia a la lisina observada en los mutantes 1333L se debe solamente al gen *lysA* mutado.

Caracterización del mutante 1333L2-2 auxótrofo a la lisina

Con el objetivo de determinar si las manipulaciones genéticas a que fueron sometidos los mutantes construidos no afectaron características deseadas para candidatos vacunales vivos de *V. cholerae*, se realizó

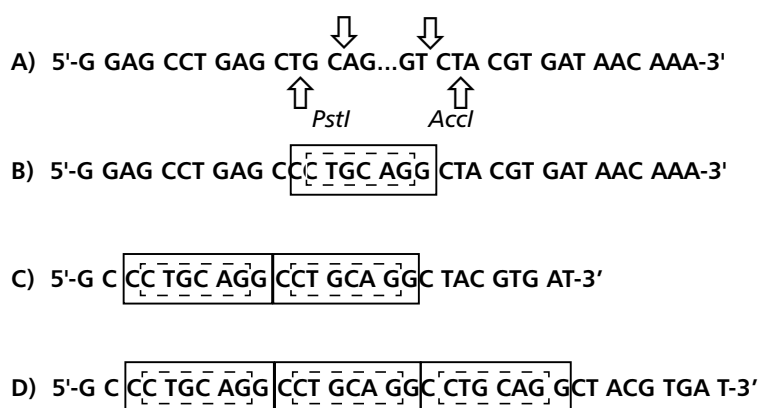


Fig. 3. Secuencia del alelo *lysA* mutado en diferentes clones del pUJMΔ*lysA*. **A:** gen *lysA* tipo salvaje, los puntos indican la región de 106 pb que fue delecionada para construir el gen mutado, flanqueada por los sitios de restricción de las enzimas *Pst*I y *Acc*I que se indican por las flechas. **B:** clon 5. **C:** clon 12. **D:** clon 3. La región enmarcada corresponde al fragmento de 8 pb añadido y en la rodeada con línea discontinua se muestra el sitio *Pst*I que este fragmento porta.

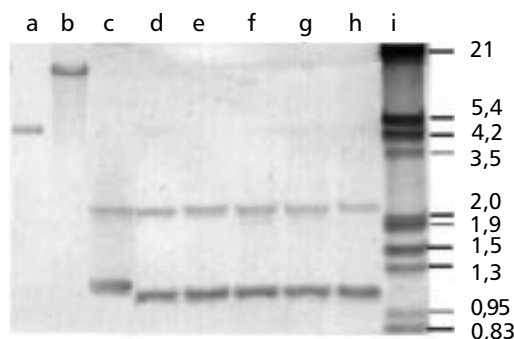


Fig. 4. Análisis por Southern blot de cepas obtenidas durante el proceso de reemplazamiento alélico del gen *lysA* en la cepa de *V. cholerae* 1333. **a)** ADNc de 1333 digerido con la enzima *Xho*I. **b)** ADNc del cointegrante 2 digerido con *Xho*I. **c)** ADNc de 1333 digerido con las enzimas *Bgl*II/*Pst*I. **d)** ADNc del segregante 1333L2-2 digerido con *Bgl*II/*Pst*I. **e)** ADNc del segregante 1333L2-3 digerido con *Bgl*II/*Pst*I. **f:** ADNc del segregante 1333L4-1 digerido con *Bgl*II/*Pst*I. **g)** ADNc del segregante 1333L4-2 digerido con *Bgl*II/*Pst*I. **h)** ADNc del segregante 1333L4-3 digerido con *Bgl*II/*Pst*I. **i)** marcador de peso molecular digerido con *Hind*III y *Eco*RI.

una evaluación del crecimiento, morfología, motilidad y colonización en el modelo del ratón lactante del mutante 1333L2-2 y se comparó con su cepa parental.

Características del crecimiento y observación morfológica de los mutantes 1333L2-2 y 1333L2-3.

Se analizaron las características del crecimiento de los mutantes 1333L2-2 en medio LB y en medio syncase mínimo con suplemento de lisina y se comparó con la cepa parental.

La mutación presente en el gen *lysA* de los mutantes no afectó la velocidad de crecimiento de las cepas mutadas en medio rico (LB). En medio mínimo (syncase + lisina) se observó un aumento ligero en el tiempo de duplicación de los mutantes con respecto al de la cepa parental (Tabla 2). Dada la pequeña magnitud de este aumento, se espera que los mutantes vacunales *lysA*

colonizen adecuadamente el tracto gastrointestinal murino y humano. Una explicación simple, pero aún no demostrada para esta diferencia de comportamiento entre medio rico y mínimo, puede ser que la transportación de lisina hacia el interior bacteriano se efectúe con eficiencias diferentes en dependencia de la composición del medio de cultivo.

La morfología del mutante 1333L2-2 durante el crecimiento en ambos medios fue similar a la morfología de la cepa parental 1333. No se detectó ningún cambio en la forma de coma, el tamaño o grosor de las células del mutante en comparación con 1333.

Ensayo de motilidad del mutante 1333L2-2

Al evaluar la motilidad de las diferentes cepas se midió el diámetro de expansión de las colonias en agar suave obteniéndose: para la cepa parental 1333: (17,2 ± 1,0) mm y para la cepa

mutada 1333L2-2: un diámetro de $(20,0 \pm 1,4)$ mm. Como puede observarse no se evidencia una diferencia marcada entre los diámetros de dispersión del mutante *lysA* y su cepa parental, por lo que se puede afirmar que la inactivación del gen *lysA* no afecta la motilidad de la cepa mutada.

Características de la colonización en el modelo de ratón lactante del mutante 1333L2-2

La colonización del mutante 1333L2-2 fue similar a la de la cepa parental 1333 (Tabla 3). Luego de 24 h de la inoculación el intestino delgado de los ratones mostró gran número de unidades formadoras de colonias en cada una de las cepas.

Este resultado evidencia que la cantidad de lisina presente en el intestino de ratón no es limitante para que exista una adecuada proliferación y por tanto, colonización del mutante autotrófico en el modelo ensayado.

El modelo del ratón lactante se utiliza ampliamente para evaluar colonización de cepas de *V. cholerae*, pues en él se ha demostrado la expresión de factores de virulencia que se conocen por ser importantes en la enfermedad humana.¹⁸ Sin embargo, se ha observado un comportamiento diferente en cuanto a la colonización de cepas no motiles en este modelo y en el hombre,¹⁹ lo que en efecto hace sospechar, como es lógico, que el modelo no es capaz de reproducir totalmente la enfermedad. Es por esto que los resultados de colonización obtenidos con el mutante 1333L2-2 auxótrofo a

lisina deben ser corroborados en humanos pues la disponibilidad de aminoácidos puede ser diferente en el intestino murino y en el intestino humano.

CONCLUSIONES

La auxotrofia a lisina obtenida mediante mutación del gen *lysA*, es una característica deseada por cuanto las cepas resultantes están limitadas en su proliferación en ausencia de este aminoácido. Esta propiedad garantiza un mejor control de pureza en los lotes vacunales y probablemente una proliferación limitada en el ambiente y al mismo tiempo, no crea cambios en características importantes para un candidato vacunal.

BIBLIOGRAFIA

- Maloy S.R., Stewart V.J. and Taylor R.K. Genetic analysis of pathogenic bacteria: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1996.
- Levine M.M., Black R.E., Clements M.L., Cisneros L., Nalin D.R. and Young C.R. The quality and duration of infection-derived immunity to cholera. *J. Infect. Dis.*, **143**, 118, 1981.
- Benítez J.A., Silva A.J., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Robert A., García H., García L., Pérez J.L., Oliva R., Torres C.A., Ledón T. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor Candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res.*, **27**, 275, 1996.
- Robert A., Silva A., Benítez J.A., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Sengupta D. K., Finkelstein M.B. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium*

thermocellum endoglucanasa A. *Vaccine*, **14**, 1517, 1996.

- Valle E., Ledón T., Cedré B., Campos J., Valmaseda T., Rodríguez B., García L., Marrero K., Benítez J., Rodríguez S., Fando R. Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholerae vaccine candidate derived from strain 638. *J. Bacteriol.*, **68**, 6411, 2000.
- De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N. Mini-Tn5 Transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, **172**, 6568, 1990.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. Messing J. Improved M13phage vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103, 1985.
- Promega corporation; USA PGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical Manual TM042, 1999.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J., Struhl K. Short protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc. New York, USA, 1995.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
- Sanger F. and Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441, 1975.
- Chomazynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analyt. Biochem.*, **201**, 134, 1992.
- Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127, 1988.
- Stoebner J.A. and Payne S.M. Iron regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Imm.*, **56**, 2891, 1988.
- Patte J.C.. Biosynthesis of threonine and lysine. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology, Ed: Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Shaechter M., Umberger E., Asm Press, Washington D.C., 1, 529, 1996.
- Richaud C., Higgins W., Mengin-Lecreulx D., and Straiger P. Molecular cloning, characterization and chromosomal localization of *dapF* the *E. coli* gene for diaminopimelate epimerase. *J. Bacteriol.*, **169**, 1454, 1987.
- Bukhari A. and Taylor A.L. Mutants of *E. coli* with grow requirement of either lysine or pyridoxine. *J. Bacteriol.*, **105**, 988, 1971.
- Taylor R.K. *et al.* Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2833, 1987.
- Gardel C.L. and Mekalanos J.J. Alteration in *V. cholerae* motility phenotypes correlated with changes in virulence factor expression. *Infection Immunity*, **64**, 2246, 1996.

Tabla 2. Crecimiento en medio LB y medio syncase suplementado con lisina de las cepas de *Vibrio cholerae* 1333 y el mutante 1333L2-2 derivado.

Medio de cultivo utilizado	Cepa de <i>V. cholerae</i>	
	1333	1333L2-2
	Tiempo de duplicación (min)	
LB	24,44 ± 1,45	25,53 ± 1,64
Syncase + lisina	41,83 ± 3,19	48,17 ± 2,54

Tabla 3. Experimento de colonización de *Vibrio cholerae* 1333, 1333L2-2 en el modelo del ratón lactante.

Cepa	Unidades formadoras de colonias	
	Inóculo	Recuperadas
1333	5,15 · 10 ⁵	4,36 · 10 ⁶
1333L2-2	7,95 · 10 ⁵	1,4 · 10 ⁶

Cada valor se corresponde con la media geométrica de las unidades formadoras de colonias en al menos cinco ratones por cepa.