

COMUNICACIÓN CORTA

Construcción y caracterización preliminar de un mutante de *Vibrio cholerae* en el gen VC0974

Karen Marrero-Domínguez, Talena Ledón-Pérez, Lisandra Cruz-Esquijarrosa y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Biología Molecular, Área de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba. Correo electrónico: karen.marrero@cnic.edu.cu

Recibido: 13 de abril de 2011.

Aceptado: 24 de junio de 2011.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, tolerancia al cobre, aerobiosis, anaerobiosis, VC0974.
Key words: *Vibrio cholerae*, copper tolerance, aerobiosis, anaerobiosis, VC0974.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda del humano debida a la infección del tracto gastrointestinal por la especie bacteriana *Vibrio cholerae*. La forma clínica más severa, el *cólera gravis*, se desarrolla en el 1 % de los casos y se caracteriza por el comienzo abrupto de diarreas profusas, vómitos y fiebre, que deshidratan y ocasionan acidosis metabólica en los enfermos. Entre el 50 y el 70 % de los pacientes de *cólera gravis* muere en ausencia de un tratamiento oportuno.¹ Durante la infección, *V. cholerae* se adapta al ambiente intestinal y se multiplica adherido a la superficie de la mucosa del intestino delgado donde secreta la enterotoxina del cólera, una proteína hexamérica cuya actividad bioquímica provoca la diarrea característica de la enfermedad. Como *V. cholerae* subsiste en el ambiente intestinal y además, en los ambientes acuáticos² se acepta que esta especie posee los sistemas de homeostasis necesarios para percibir y adaptarse a los cambios de composición iónica, nutricional, aceptor final de electrones y otras condiciones que diferencian a estos dos nichos.²

El cobre es un elemento traza esencial que existe en ambos ambientes y su exceso es tóxico a los organismos.³ En las condiciones ácidas y anaerobias del tracto gastrointestinal este elemento se hace tóxico para los microorganismos en dosis más bajas, por lo que las enterobacterias poseen mecanismos de homeostasis para controlar la concentración intracelular de este metal.⁴ En *Escherichia coli*, los principales mecanismos de tolerancia al cobre involucran su expulsión fuera del citoplasma y del espacio periplasmático a través de la ATPasa tipo-P CopA y del sistema transportador multi-componentes CusCFBA, respectivamente; así como su destoxicificación periplasmática por la oxidasa multi-cobre CueO.⁴ Los genes codificantes de factores de homeostasis del cobre están regulados por el propio ion Cu⁺ presente en el citoplasma y el periplasma a través del activador transcripcional CueR y el sistema bi-componente CusSR, respectivamente.⁴ El sistema Cue, constituido por CopA, CueO y CueR es el responsable principal de la resistencia al cobre en aerobiosis y Cus es un sistema secundario.⁵ Aunque no es esencial para la tolerancia a cobre en aerobiosis, este sistema secundario es necesario cuando la

concentración de cobre satura la capacidad exportadora del sistema Cue o en caso de discapacidad parcial o total de este sistema. En anaerobiosis, condición en la que la toxicidad del cobre aumenta y CueO no funciona, el sistema Cus también es necesario para una completa tolerancia a este metal.^{5,6}

La proteína CueR de *E. coli* es un activador transcripcional de la familia MerR.^{7,8} Miembros de esta familia se han encontrado en una gran variedad de géneros bacterianos, pero no en eucariotas.⁹ La familia de reguladores MerR comprende un grupo de proteínas que presenta una región de unión al ADN en el N-terminal muy similar y una región diversa en el C-terminal, de unión a las moléculas efectoras, la que es específica para el efecto reconocido.⁹ La mayoría de los reguladores en la familia responde a estímulos ambientales, tales como el estrés oxidativo, metales pesados o antibióticos. Un subgrupo de la familia MerR activa la transcripción en respuesta a los iones metálicos. Este subgrupo muestra una similitud de secuencia tanto en la región de unión de la molécula efectora en el C-terminal como en la región N-terminal.⁹ La especificidad por el cobre en el caso de CueR de *E. coli* y demás miembros de la familia MerR involucrados en la resistencia a cobre, está dada por el espaciamiento de siete aminoácidos entre las cisteínas conservadas 112 y 120 de la región C-terminal.⁸

Como enteropatógeno del humano, *V. cholerae* requiere de sistemas de tolerancia al cobre para sobrevivir en la condición intestinal anaerobia y ligeramente ácida. La elucidación de estos sistemas y su papel durante la patogénesis de *V. cholerae* son aspectos de interés para comprender los mecanismos de adaptación usados por este microorganismo durante la infección del humano. Por ello, se hace necesario identificar a los genes potencialmente involucrados a través de métodos bioinformáticos y posteriormente, clonar a los genes identificados y obtener mutantes en dichos genes para estudiar si las proteínas codificadas por estos tienen una función fisiológica *in vitro*. Un análisis de la sensibilidad al cobre de mutantes de *V. cholerae* en los genes que codifican para las proteínas hipotéticas VCA0261-VCA0260 y VC2216 y para la ATPasa CopA, codificada por el gen VC2215,

demostró que estos están relacionados con la tolerancia al cobre en aerobiosis y anaerobiosis.^{10,11} Sin embargo, no se identificó al o los regulador(es) que controlan la expresión de estos genes y que median la resistencia al cobre. Un estudio *in silico* de la conservación en *V. cholerae* de los sistemas de tolerancia descritos en *E. coli* reveló que el gen VC0974 es homólogo al regulador *cueR* y en la base de datos SWISS-PROT su producto génico está anotado, por similitud de secuencias, como CueR (<http://www.expasy.org/uniprot/P0C6D2>).¹¹ Sin embargo, no existen evidencias experimentales que corroboren esta asignación. Tomando en consideración estos antecedentes, el presente trabajo se propuso abordar la clonación del gen VC0974 y la obtención de mutantes de supresión de *V. cholerae* en dicho gen para caracterizarlos en cuanto a su sensibilidad al cobre.

Clonación de VC0974 y mutagénesis *in vitro*.

Se amplificó un fragmento de 1241 pb a través de una reacción en cadena de la polimerasa utilizando como molde el ADN cromosomal de la cepa de *V. cholerae* C7258¹⁰ y el par de oligonucleótidos directo y reverso 5'-AGCAACTGAACTCGGATT-3' y 5'-GGGTATTGCT-GGCCG-3' (Fig. 1A). El fragmento de ADN obtenido (Fig. 1A, línea discontinua) se cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* y el segmento de 1142 pb resultante, se clonó en el plasmidio pIJ2925¹² digerido con las mismas enzimas, con lo que se obtuvo el plasmidio pIJ-VC0974. El fragmento clonado en él incluyó a los nucleótidos que codifican para los últimos 110 aminoácidos del producto génico de VC0973 (una proteína hipotética), el producto génico de VC0974 completo y los últimos 102 aminoácidos de la proteína codificada por el gen VC0975 (una proteína hipotética conservada). A continuación, para mutar el gen VC0974, el plasmidio pIJ-VC0974 fue cortado con las enzimas *ClaI* y *SacI* que escinden un segmento de 383 pb que incluye los tripletes codificadores para los últimos nueve aminoácidos del producto génico de VC0973 y los primeros 98 aminoácidos del producto génico de VC0974 (Fig. 1A). El fragmento restante de 3409 pb se purificó y sus extremos se trataron con la enzima T4 ADN polimerasa y se religaron con T4 ADN ligasa, para obtener el plasmidio pIJ-ΔVC0974, el cual fue digerido posteriormente con la enzima *BglII*, cuyos sitios se encuentran flanqueantes al sitio múltiple de clonaje del plasmidio pIJ2925¹² y escinden el fragmento clonado de 768 pb que contiene la delección. Este segmento se clonó en el vector suicida pCVD442B¹³ digerido con *BglII* y se obtuvo el pCV-ΔVC0974. El fragmento clonado en este plasmidio tiene delecionado el segmento de 383 nucleótidos comprendido entre los sitios de corte para las enzimas *ClaI* y *SacI* (Fig. 1A) que incluye los tripletes codificadores para los últimos nueve aminoácidos del producto génico de VC0973 y los primeros 98 aminoácidos del producto génico de VC0974. Teóricamente, a raíz del ligamiento de los extremos generados por la digestión con las enzimas *ClaI* y *SacI* y posterior tratamiento con la T4 ADN polimerasa, se debe crear un codón de parada en el mismo marco de lectura del producto génico de VC0973 de manera que se eliminan los últimos nueve aminoácidos y se suman tres nuevos a su extremo carboxilo terminal. La secuenciación nucleotídica del clon seleccionado corroboró que ocurrió la delección de 384 pb, pero la secuencia de la fusión de los extremos generados por el corte de las enzimas y tratamiento con la T4 polimerasa no se correspondió con la esperada. La secuencia de esta región mostró que a continuación de la delección, se generó un codón de parada en el mismo

marco de lectura del gen VC0973, con lo que se adicionó un aminoácido al C-terminal de su producto génico. Se asumió que el cambio de los últimos nueve aminoácidos presentes naturalmente en el producto génico de VC0973 por el nuevo que se generó según la secuenciación nucleotídica no afectaría la tolerancia al cobre en la cepa que contuviera esta modificación.

Modificación genética de *V. cholerae* C7258 para mutar el gen VC0974.

Se remplazó el fragmento de restricción *EcoRI*-*PstI* (Fig. 1A) del cromosoma de *V. cholerae* C7258 por el fragmento genéticamente modificado presente en el plasmidio suicida pCV-ΔVC0974, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.¹³ La estructura génica del cointegrado con el pCV-ΔVC0974 y de 10 de sus segregantes derivados, se evaluó por digestión de los ADN cromosómicos con la enzima *XbaI* e hibridación de ácidos nucleicos de tipo *Southern blot* mediante el uso como sonda del fragmento *BglII* de ~1,1 kb derivado del plasmidio pIJ-VC0974 que contenía al gen VC0974 (Fig. 1A). En el ADN cromosomal de la cepa salvaje C7258, la sonda hibridó con dos fragmentos de restricción *XbaI* de ~ 5,5 kb y ~ 6,8 kb (Fig 1B, carril a), que se correspondían con los fragmentos cadena arriba y abajo, respectivamente, del sitio de corte de *XbaI* dentro de VC0974 (Fig. 1A). En el ADN del cointegrado, la sonda hibridó con dos fragmentos de restricción *XbaI* de ~ 13,9 kb y ~ 5,5 kb (Fig 1B, carril b), lo que indicó que la integración del plasmidio suicida de 7,1 kb, que no contenía sitio de corte para *XbaI* en su secuencia, ocurrió por la región cuesta abajo de la delección realizada *in vitro* al gen VC0974 (dentro del fragmento de 6,8 kb, Fig. 1A). Los mutantes, por otra parte, debían generar una única banda de ~ 12 kb, ya que el sitio de corte para *XbaI*, presente en el interior del gen VC0974, se encontraba en el fragmento que se delecionó (Fig. 1A). En el ADN de seis de los 10 segregantes evaluados, la sonda hibridó con un fragmento *XbaI* de ~ 12 kb, lo que indicó la presencia en el cromosoma del gen VC0974 mutado (Fig. 1B, carril c y d). Entre los segregantes evaluados se encontró el C7258-ΔVC0974-1, el cual se seleccionó para hacer un análisis de su sensibilidad al cobre.

Sensibilidad al cobre del mutante en el gen VC0974 derivado de *V. cholerae* C7258.

La sensibilidad al cobre de la cepa parental *V. cholerae* C7258 y el mutante C7258-ΔVC0974-1, se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria de CuSO_4 en placas del medio de cultivo *syncase* en aerobiosis y anaerobiosis, según lo descrito anteriormente.¹⁰ La concentración mínima inhibitoria del CuSO_4 para la cepa mutante fue menor que para la cepa salvaje en ambas condiciones de cultivo (Tabla 1). Además, las colonias de la cepa mutante en aerobiosis y 0,5 mmol/L de CuSO_4 variaron su morfología y en 1 mmol/L de CuSO_4 disminuyeron su tamaño apreciablemente respecto a las colonias de la cepa salvaje (Fig. 1C). Estos resultados sugirieron que la mutación introducida en el gen VC0974 afecta la tolerancia al cobre en ambas condiciones de cultivo, aunque no se debe descartar *a priori* una posible influencia de la modificación realizada en el C-terminal del producto génico de VC0973.

Para determinar si el aumento de la sensibilidad al cobre en el mutante se debía a la delección realizada al gen VC0974, la cepa mutante C7258-ΔVC0974-1, se transformó con el plasmidio pIJ-VC0974, que contiene una copia salvaje del gen VC0974 y como control, con el plasmidio

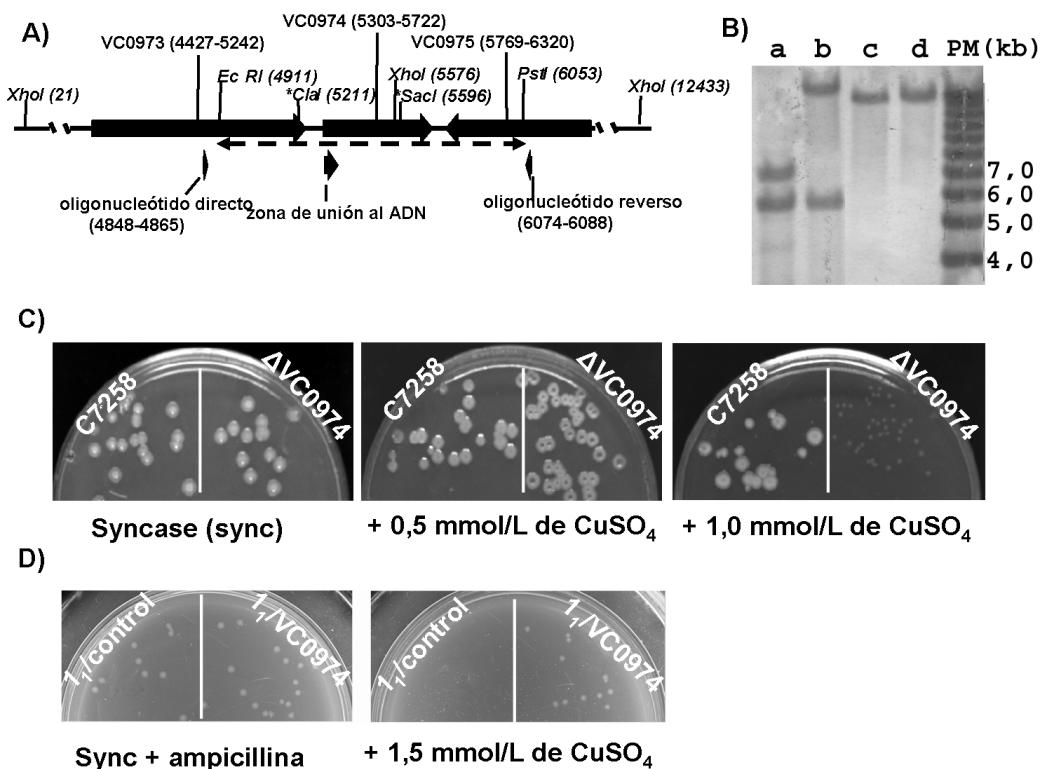


Fig. 1. A) Organización génica de la región del cromosoma adyacente a VC0974. Entre paréntesis se encuentran las coordenadas relativas de los genes representados por flechas y de los sitios de corte de las enzimas de restricción y los oligonucleótidos usados en el estudio. La flecha discontinua señala el fragmento de ADN clonado, el que se utilizó además, como sonda en el análisis por Southern blotting. B) Análisis por Southern blotting de la estructura genética de los cointegrados y segregantes obtenidos durante la construcción de los mutantes en el gen VC0974. a) ADN cromosomal de C7258; b) ADN cromosomal del cointegrado de C7258-pCV-ΔVC0974-1; c y d) ADN cromosomal de los segregantes C72ΔVC0974-11 y C72ΔVC0974-12. A la derecha, marcador de peso molecular de 1 kb de Invitrogen. C) Sensibilidad de las cepas de *V. cholerae* C7258, C7258 y su derivado ΔVC0974, C72ΔVC0974-11 a diferentes concentraciones de CuSO4 en aerobiosis. D) Análisis de complementación del mutante C72ΔVC0974-11 transformado con el plasmidio pIJ-ΔVC0974, 11/control o con el plasmidio pIJ-VC0974, 11/VC0974.

Tabla 1. Sensibilidad al cobre de *V. cholerae* C7258 y la cepa derivada mutante en el gen VC0974

Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*	
	+O ₂ μmol/L de CuSO ₄	-O ₂ μmol/L de CuSO ₄
C7258	4000	200
C72ΔVC0974-1 ₁	1500	100

* La CMI para cada cepa se determinó en placas de syncase que contenían cantidades crecientes de CuSO₄ en aerobiosis (+O₂; de 62,5 μmol/L a 4000 μmol/L) y anaerobiosis (-O₂; de 1,5 μmol/L a 200 μmol/L).

pIJ-ΔVC0974, que contiene una copia mutada. Tres de los transformantes obtenidos en cada caso, se crecieron en medio de cultivo syncase suplementado con 1,5 mmol/L de CuSO₄ y ampicillina a 100 μg/mL en aerobiosis durante 24 h. La cepa mutante transformada con el pIJ-VC0974 creció en presencia de cobre; sin embargo, la cepa transformada con el pIJ-ΔVC0974 no creció en estas condiciones (Fig. 1D). Este resultado confirmó que la disminución de la tolerancia al cobre observada en el mutante fue consecuencia de la delección realizada en el gen VC0974 y vincula su producto génico con este proceso.

El producto génico de VC0974 fue anotado como un regulador transcripcional perteneciente a la familia de reguladores MerR en la primera anotación del genoma de *V. cholerae*¹⁴ y posteriormente, como CueR en la base

de datos SWISS-PROT. En concordancia, el producto génico de VC0974 posee las secuencias conservadas presentes en la región N-terminal de la hélice de dimerización y en la cavidad del sitio de unión de metales, donde se encuentran las cisteínas importantes para la unión a cobre,¹¹ predichas según un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CueR de *E. coli* y otros homólogos, tomando como base la estructura cristalina de CueR de *E. coli*.¹⁵ En este microorganismo, CueR es activado por los iones Cu⁺ y Ag⁺ presentes en el citoplasma y activa la expresión de los genes copA y cueO.^{7,8} De acuerdo con los resultados, este trabajo propone que el producto génico de VC0974 confiere resistencia a cobre en *V. cholerae* a través de la activación de la expresión de los genes involucrados en la tolerancia a cobre, en

particular de VC2215, que codifica para la ATPasa CopA.¹¹ Sin embargo, debido a que en un análisis del genoma de *V. cholerae* El Tor N16961 no se identificó ninguna proteína que fuera homóloga a CueO,¹¹ sería interesante determinar si el producto génico de VC0974 regula, además, la expresión del gen VCA0261-VCA0260, el que codifica para una proteína necesaria para la tolerancia al cobre en aerobiosis.¹⁰ Coincidentemente, un análisis filogenético reciente identificó al gen VC0974 como el homólogo de CueR en *V. cholerae* y encontró como posibles sitios operadores diana a secuencias presentes cuesta arriba de los genes VC2215 y VCA0262.¹⁶ El gen VCA0262 se encuentra cuesta arriba del gen VCA0261-VCA0260 y se transcribe en la misma orientación que este,¹⁴ por lo que pudieran constituir una unidad transcripcional.

En conclusión, con este trabajo se demostró experimentalmente que el gen VC0974 de *V. cholerae* está involucrado en la tolerancia al cobre en aerobiosis y anaerobiosis. Este gen codifica para un homólogo del regulador transcripcional CueR, según una predicción hecha por un análisis de su secuencia aminoacídica.^{11,16} El mutante obtenido será útil para determinar qué genes son activados por este regulador en respuesta a cobre, de modo que se puedan develar los sistemas utilizados por *V. cholerae* para tolerar concentraciones tóxicas de este elemento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atia A, Buchman AL. Treatment of cholera-like diarrhoea with oral rehydration. Ann Trop Med Parasitol. 2010;104(6):465-474.
2. Cho YJ, Yi H, Lee JH, Kim DW, Chun J. Genomic evolution of *Vibrio cholerae*. Curr Opin Microbiol. 2010;13(5):646-651.
3. Osman D, Cavet JS. Copper homeostasis in bacteria. Adv Appl Microbiol. 2008;65:217-247.
4. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol Rev. 2003;27(2-3):197-213.
5. Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 2001;276(33):30670-30677.
6. Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2003;185(13):3804-3812.
7. Outten FW, Outten CE, Hale J, O'Halloran TV. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. J Biol Chem. 2000;275(40):31024-31029.
8. Stoyanov JV, Hobman JL and Brown NL. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. Mol Microbiol. 2001;39(2):502-511.
9. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiol Rev. 2003;27(2-3):145-163.
10. Marrero K, Duany N, Sánchez A, González LJ, Suzarte E, Ledón T et al. Estudio de los genes VCA0260 y VCA0261 de *Vibrio cholerae* y de la proteína única que codifican. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(2):124-131.
11. Marrero K, Fando R. Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2010;40(3):186-198.
12. Janssen GR, Bibb MJ. Derivatives of pUC18 that have BglII sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. Gene. 1993;124(1):133-134.
13. Valle E, Ledón T, Cedré B, Campos J, Valmaseda T, Rodríguez B et al. Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholera vaccine candidate derived from strain 638. Infect Immun. 2000;68(11):6411-6418.
14. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 2000;406(6795):477-483.
15. Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV et al. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. Science. 2003;301(5638):1383-1387.
16. Perez Audero ME, Podoroska BM, Ibanez MM, Cauerhoff A, Checa SK, Soncini FC. Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. Mol Microbiol. 2010;78(4):853-865.