



INTRODUCCIÓN

Toxinas Formadoras de Poros (PFT).

Las toxinas formadoras de poros son una familia (PFT del inglés Pore Forming Toxin) heteróloga que constituye una clase única de proteínas citotóxicas por daño a la membrana, que ataca a las células blanco mediante la formación de poros oligoméricos transmembranales. Esta familia a su vez se divide en dos grupos: α y β . En la naturaleza las PFT constituyen un componente importante en la toxicidad del veneno de insectos, víboras y anémonas. A este grupo formador de β -barril anfipático pertenecen también las toxinas α - hemolisina de *Staphylococcus aureus*, aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (1) y la citolisina VCC.

La VCC es una de los pocos miembros de la familia PFT que exhiben una arquitectura de dominios atípicos, en su forma madura, la pro-VCC alberga tres dominios adicionales, que no están normalmente presentes en la mayoría de las toxinas clasificadas con los β -PFT(2).

La citolisina VCC se puede encontrar en tres formas estables; en primer lugar como monómero soluble en agua con una masa molecular de 65 KDa, con actividad hemolítica, segundo como oligómero; y tercero como un heptámero anfipático β -barril. (3)

La unión de la toxina monomérica con la membrana es reversible (4), los monómeros de la toxina se unen a través de su extremo carboxilo (5), forman un poro de beta barril con un diámetro interno de aproximadamente 1-2 nm (6) y esto genera un poro que interviene en el flujo pasivo de moléculas de iones cloro a través de la membrana, capaz de formar un canal selectivo permeable a iones K^+ , pero no a iones Ca^{+2} (4).

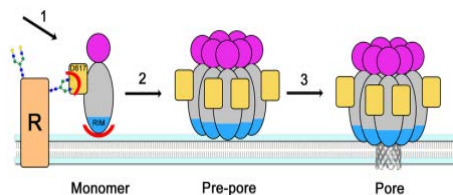


Figura 1 Representación esquemática de los pasos de la formación de poros heptaméricos de la VCC, utilizando la unión N-glicano, en el receptor de superficie celular (R), por su dominio Lectina β -prisma (amarillo).



Biosíntesis del monómero de la VCC.

El proceso de biosíntesis de la proteína VCC se conoce desde hace décadas. A partir del gen *hlyA* se expresa un RNA mensajero que da lugar a una pre-pro-toxina de 82 kDa que presenta un procesamiento proteolítico, produciendo una pro-toxina de 79 kDa después de haber eliminado un péptido señal. El péptido señal se elimina durante la secreción a través de la membrana interna de la bacteria. La pro-toxina a su vez, se encuentra en el espacio intermembranal bacteriano y se procesa hasta llegar a una proteína madura activa de 65 kDa, (que conocemos como el monómero de la VCC), después de haber perdido un polipéptido de 14 kDa de su extremo amino terminal que es secretada, esto ocurre el medio extracelular (3). Datos experimentales sugieren que el procesamiento proteolítico de la pro-toxina es un paso esencial en la activación de la citolisina (8).

La VCC es secretada por la bacteria al medio (5), lo que permite encontrar esta citolisina en los sobrenadantes de caldos de cultivo bacterianos, sin necesidad de lisar a la bacteria para extraer la toxina.

Mecanismo de acción propuesto para la VCC.

Cuando la citolisina VCC se inserta en la membrana citoplásmica de la célula, ella genera poros en la bicapa con la estructura β -barril, lo que lleva a la célula a presentar un espectro de respuesta al daño que va desde la inducción de autofagia hasta la muerte celular por necrosis, pasando por la apoptosis.

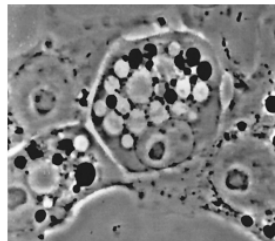


Figura 3 Célula Vero expuesta a una dilución 1/500 del sobrenadante de *V. cholerae*, durante tres horas y teñido con rojo neutro. Figueroa-Arredondo y cols. (2001), presenta generación de vacuolas.



OBJETIVO GENERAL.

Se determinara la secuencia de nucleótidos del gen *hlyA* de la toxina VCC, para compararlo con secuencias genéticas de este mismo gen, reportadas previamente.

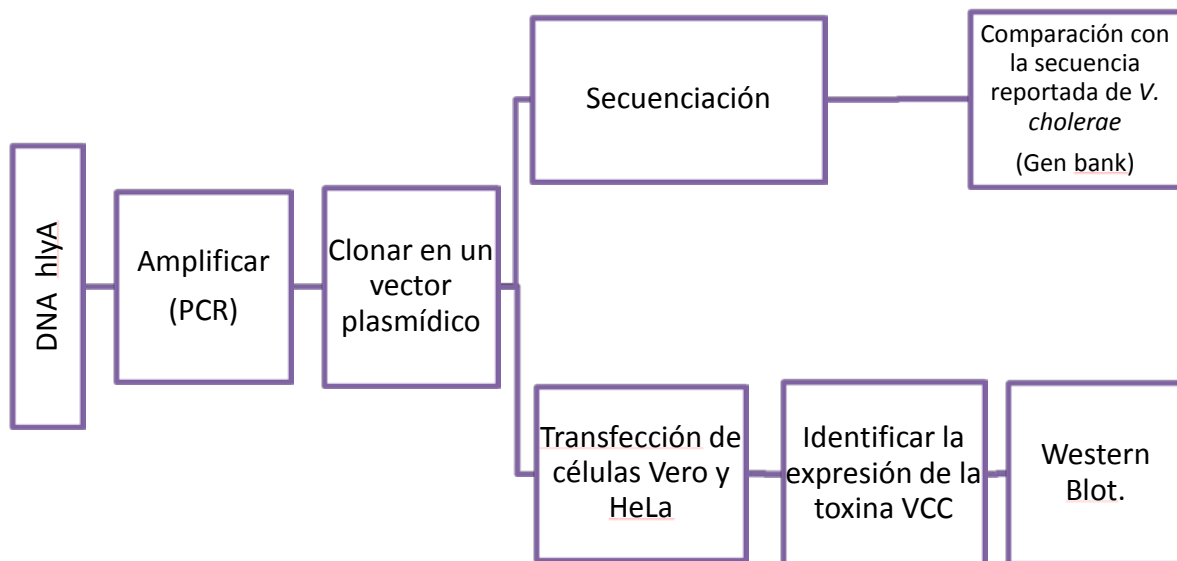
OBJETIVOS PARTICULARES.

Caracterizar la secuencia del DNA del gen de la VCC a partir de la bacteria hiperproductora de *V. Cholerae*.

Realizar un análisis de comparación *in silico* de la secuencia de nucleótidos de la VCC, con secuencia publicada.

Determinar si el gen se expresa en una célula eucarionte y observar los probables efectos citotóxicos, por la citolisina VCC.

METODOLOGÍA.



RESULTADOS.

Amplificación por PCR del gen hlyA.

A partir del gen nativo *hlyA* de la cepa hiperproductora 52201, se realizó una amplificación por PCR. Para corroborar que se obtuvo el DNA del gen de interés, se realizó electroforesis en agarosa al 0.8% (Figura 4), para observar el fragmento de DNA con el peso esperado de 2.2 Kb.

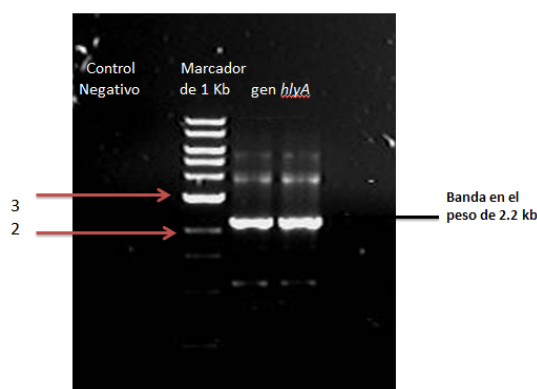


Figura 4 Fotografía final de la electroforesis del gel de agarosa al 0.8% de la amplificación del gen *hlyA*. 1) Control negativo (sin DNA) 2) marcador de peso molecular 1Kb 3). Producto de la PCR del gen *hlyA*, en el peso esperado de 2.2 Kb.

Una vez que se se obtuvo el fragmento esperado de 2.2Kb, éste se clonó en el plásmido pCMV-MCS dentro del sitio *Sma* I. Obteniendo la siguiente construcción.

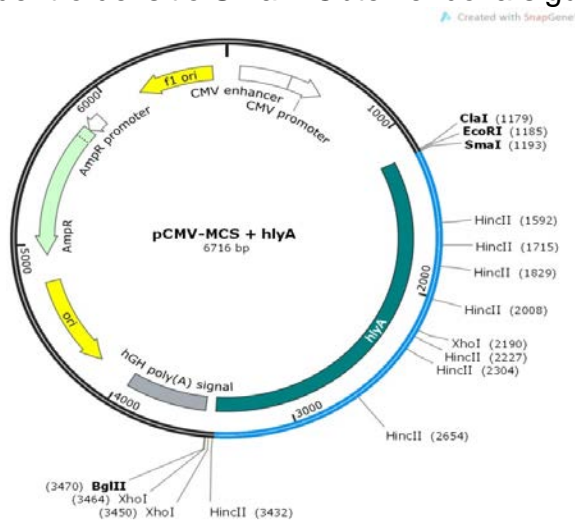


Figura 5 Construcción generada conteniendo el inserto de *hlyA* (2.2Kb), en el sitio de restricción *Sma*I, mostrando también las ER que cortan dentro de la secuencia.



Posteriormente se realizó la ligación de este plásmido pCMV-MCS (Figura 5) con células DH5 α , y se obtuvieron varias colonias con el inserto del plásmido.

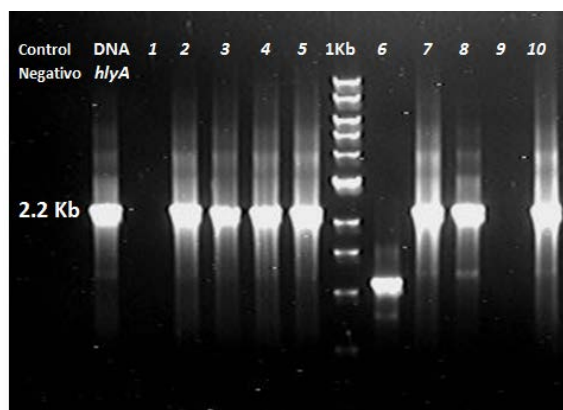


Figura 61 Amplificación del inserto de *hlyA* a partir de las clonas obtenidas. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos amplificados por PCR, demostrando que las clonas en pCMV-MCS contienen el inserto del gen *hlyA*. Las muestras se enumeraron en orden ascendente

De estas 7 clonas donde se observó el tamaño de banda esperado, se seleccionaron dos y se enviaron a secuenciar; por el método automatizado de Sanger, con el diseño de 6 nuevos primers de secuenciación se obtuvo la secuencia completa del gen *hlyA*, con un peso de 2.2 Kb. Observando algunas diferencias con el mismo gen de la cepa de *V. cholerae* El Tor ya reportado en el Gen Bank.

Transfección de Vero y Hela con las clonas conteniendo *hlyA*.

En búsqueda de cambios en la morfología de las células Vero y HeLa, debido al efecto de la citolisina VCC transfectada, se decidió tomar del primer plásmido pCMV-MCS + *hlyA*, solamente el fragmento de la proteína madura de la VCC (65 KDa, 1749 pb) y transferirlo al plásmido pAAV-IRES-hrGFP. Dicho plasmido permitiría observar una VCC marcada con fluorescencia en color verde; se vería la expresión basal de la citolisina VCC en las células. Además se analizó la presencia de este plásmido por medio de un Western Blot.

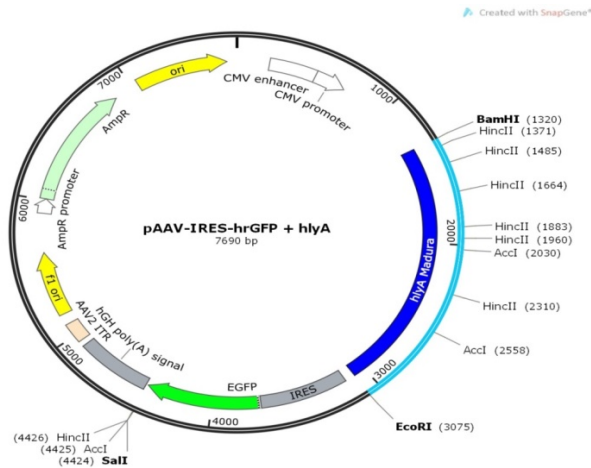


Figura 72 Construcción del plásmido pAAV-IRES-hrGFP con la fracción de hlyA (65 KDa).

CONCLUSIONES.

Se obtuvo la secuencia completa (2222Kb) de la proteína VCC de la cepa hiperproductora de *V. Cholerae* No O1 52201, reportada en el estudio previo Figueroa, 2001 del efecto citotóxico vacuolizante de la VCC. Esta secuencia se encuentra lista para ser reportada al Gen Bank.

A partir de los datos de la secuencia obtenida de la cepa hiperproductora de la VCC, presenta diferencias puntuales (cambios de base) con respecto a la secuencia de *V. cholerae* El Tor reportada por Manning en 1984, con numero de referencia en el Gen Bank *V. cholerae* El Tor N16961 (taxid: 243277).

La primera clona diseñada se basa en el plásmido pCMV-MCS conteniendo el segmento completo de 2222 Kb con el gen de hlyA que tiene la pre-prototoxina de la citolisina VCC (82 KDa). Esta clona requiere de procesamiento proteolítico para obtener la proteína monomérica adecuada para el ensamble del poro heptamérico y por consecuencia el efecto citotóxico por la formación de poros.

Al observar el efecto de las dos clonas que expresan la proteína de la citolisina VCC en células Vero y HeLa, no se logró observar el efecto citotóxico ni cambios morfológicos en ambas líneas celulares por lo que se deduce que quizá no hubo expresión del gen dentro de la célula.



BIBLIOGRAFIA.

1. Kumar Rai A, Chattopadhyay K. (2015) Revisiting the membrane interaction mechanism of a membrane-damaging β -barrel pore-forming toxin *Vibrio cholerae* cytolysin. *Molecular Microbiology* 97(6), 1051–1062
2. Paul K, Chattopadhyay K. (2011) Unfolding distinguishes the *Vibrio cholerae* Cytolysin precursor from the mature form of the toxin. *Biochemistry*; 50: p. 3936-3945.
3. Dutta S, Mazumdar B, Banerjee K, Ghosh A N. (2010) Three-Dimensional Structure of Different Functional Forms of the *Vibrio cholerae* Hemolysin Oligomer: a Cryo-Electron Microscopic Study. *Journal of Bacteriology*, Vol. 192, No. 1 p. 169–178
4. Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S, Husmann M. (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Comm*; 385: 503-506.
5. Elluri S, Enow C, Vdovikova S, Rompikuntal P K, Dongre M, Carlsson Sven, Pal A, Uhlin B E, Sun Nyunt W. Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains.
6. Khilwani B, Chattopadhyay K. (2015) Signaling beyond Punching Holes: Modulation of Cellular Responses by *Vibrio cholerae* Cytolysin. *Toxins* ISSN 2072-6651
7. Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay A K, Shimada T, Takeda Y, Berg D E, Nair G B, (2000) Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 68, 1928–1933.
8. Castañón-Sánchez C A, Artículo de revisión: Toxina VCC de *Vibrio cholerae*: de la vacuolización a la muerte celular. (2012) Evidencia médica e investigación en salud. Vol. 5, Núm. 4, pp 114-119.