

Aislamiento y caracterización preliminar de una forma recombinante de la proteína RstB del fago CTX ϕ de *Vibrio cholerae*

Alina Falero, Andy Caballero, Beatriz Ferrán, M. Emilia Hervé, Rafael Fando y Javier Campos.

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: alina.falero@cnic.edu.cu

Recibido: 30 de abril de 2008. Aceptado: 15 de septiembre de 2008.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, proteína RstB, ADN cadena simple.
Key words: *Vibrio cholerae*, RstB protein, single stranded DNA.

La bacteria *Vibrio cholerae* es el agente causal de la enfermedad diarreica aguda denominada cólera.¹ El factor de virulencia principal de este patógeno es la toxina del cólera, causante de las diarreas copiosas que se producen en el curso de la enfermedad.¹ Los genes *ctxAB*, que codifican para esta toxina, se localizan en el genoma del fago lisogénico CTX ϕ , el cual a su vez, se encuentra integrado en el genoma de las cepas toxigénicas de *V. cholerae*.²⁻⁴ Este fago es capaz de pasar a la forma replicativa e infectar a poblaciones bacterianas de *V. cholerae* que expresen el receptor del fago, por lo que pueden transmitir potencialmente los genes de la toxina a cepas ambientales no patogénicas y convertir las en virulentas.² De aquí, la importancia que ha cobrado en los últimos años, el estudio de la biología molecular del fago CTX ϕ .

RstB es una proteína codificada por el gen *rstB* del genoma del bacteriófago CTX ϕ . M. K. Waldor y cols. le asignaron un papel a RstB en la integración del fago CTX ϕ al cromosoma bacteriano basados en un estudio funcional a través de mutagénesis del gen *rstB* por inserción del transposon Tn10d-kan.⁵ Sin embargo, dos argumentos fundamentales cuestionan que RstB juegue un papel directo en el proceso de integración del genoma fago: (i) RstB no presenta similitud aminoacídica con ninguna recombinasa conocida⁵ y (ii) ha sido demostrado que la integración de CTX ϕ depende de las recombinasas XerCD de la célula bacteriana hospedera.^{1,6} XerC y XerD catalizan la integración sitio específica de CTX ϕ al sitio *dif* del cromosoma I de *V. cholerae*; sin embargo, el papel de RstB en este proceso no ha sido esclarecido, pues esta proteína no ha sido purificada ni su actividad bioquímica demostrada. Basados en la homología en cuanto a tamaño y posición relativa del gen *rstB* dentro del genoma de CTX ϕ con respecto a otros fagos filamentosos descritos, Campos y colaboradores han sugerido que RstB podría tener la función de unión al ADN genómico de simple cadena (ADNcs) del fago durante el ciclo biológico de este.⁷

Para investigar las hipótesis mencionadas arriba sobre la función de RstB en la biología molecular del fago CTX ϕ , es necesaria la obtención de esta proteína con un

nivel de pureza y una cantidad suficientes para realizar estos estudios. Con este objetivo, en este trabajo se construyó una versión recombinante de RstB fusionada a una cola de seis histidinas (RstB-His) clonada en un vector de expresión y se diseñó un protocolo de purificación de esta por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados y se evaluó la actividad de unión a ADNcs de la proteína obtenida. Se obtuvo la proteína RstB-His biológicamente activa con un 80 % de pureza.

Para la clonación del gen *rstB* primeramente éste se amplificó por PCR, desde el genoma del fago CTX ϕ , utilizando los oligonucleótidos CNC06-171(5'-AGTTCCATGGGGAAATTATGGGTG-ATTAAT-3') y CNC06-173 (5'-CATCAAGCTTTAATGGGT-3'). Estos oligonucleótidos introducen sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* en los extremos 5' y 3', respectivamente del fragmento de ADN amplificado, que fueron utilizados para clonar el gen en iguales sitios del vector de expresión pBAD/Myc-His C (Invitrogen), el cual incluye el gen de resistencia a ampicilina. La construcción obtenida se denominó pBAD/Myc-HisC-rstB 9 y contenía al gen *rstB* fusionado a una cola de seis residuos de histidinas por su extremo carboxiterminal y bajo el control del promotor araBAD, el cual es inducible por arabinosa. La construcción genética se chequeó mediante secuenciación de ADN y se comprobó que tanto la secuencia como el marco de lectura del gen fusionado a la cola de histidinas eran correctos.

Para la expresión de la proteína RstB, el plasmidio pBAD/Myc-HisC-rstB 9 se introdujo mediante electroporación en la cepa de *Escherichia coli* Top 10. La cepa transformada con el plasmidio fue cultivada en 5 mL de caldo LBA (NaCl, 10 g · L⁻¹; triptona, 10 g · L⁻¹; extracto de levadura, 5 g · L⁻¹ y ampicilina, 100 mg · mL⁻¹) en zaranda orbital termostata a 200 r/min durante toda una noche a 37 °C. Un mililitro del cultivo se transfirió a 300 mL de caldo LBA y se cultivó en zaranda en iguales condiciones hasta alcanzar 0,5 unidades de densidad óptica (λ , 600 nm). La expresión de RstB se indujo a continuación por adición de arabinosa a una concentración de 0,002 % (p/v) e incubación en zaranda orbital termos-

tatada por 3 h a 200 r/min y 37 °C. La expresión de la proteína se comprobó por el perfil proteico analizado por SDS-PAGE de los cultivos antes y después de adicionar el inductor. Tras la inducción se detectó una banda de tamaño molecular aparente calculado en 16 kDa (Fig.1, Panel B, carril 3) que no se detecta antes de la inducción (Fig.1, Panel B, carril 2). Esta talla se corresponde con la esperada para la proteína RstB recombinante fusionada a la cola de His.

Los cultivos inducidos fueron centrifugados durante 10 min a $6\,000 \times g$ a 4 °C y el sedimento celular se lavó con disolución estabilizadora de fosfato de sodio 20 mmol/L; pH 8,0 (Na_2HPO_4 , 20 mmol/L; NaCl, 0,5 mol/L; imidazol, 10 mmol/L). Las células fueron colectadas por centrifugación durante 10 min a $6\,000 \times g$, 4 °C y resuspendidas en 15 mL de la misma disolución estabilizadora. La suspensión se sometió a diez ciclos de sonicación de 30 s cada uno (55 W), en un desintegrador ultrasónico, seguido de 30 s de incubación en baño de hielo. El extracto crudo se centrifugó durante 15 min a $9\,000 \times g$ y 4 °C.

La detección de la localización de la proteína RstB-His se realizó mediante SDS-PAGE de las fracciones celulares obtenidas tras la ruptura ultrasónica de las células del hospedero de expresión *E. coli* Top10. La proteína se localizó fundamentalmente en la fracción insoluble de los cultivos inducidos (Fig.1, Panel B, carril 5), lo que determinó la necesidad de emplear urea 8 mol/L durante 12 h para la completa solubilización en disolución estabilizadora de fosfato de sodio 20 mmol/L pH 8,0 (Fig.1, Panel B, carril 6). El extracto se aplicó a la columna de cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados IMAC (Ni-CAM HC) y la urea fue removida empleando un gradiente lineal desde 8 mol/L a 0 mol/L de urea, mientras la proteína se mantenía enlazada a la resina, de acuerdo con un protocolo descrito anteriormente.⁸

La proteína RstB-His queda retenida en la matriz mientras transcurre el gradiente de urea y eluye con 250 mmol/L de imidazol. (Fig. 1, panel B, carril 7), lo que permitió su solubilización sin precipitación significativa en la columna. La elución de la proteína con imidazol 250 mmol/L indicó que las interacciones proteína-resina

son fuertes, lo cual permitió la realización de lavados previos con diferentes concentraciones de imidazol (20 y 50 mmol/L) que eliminaron otras proteínas contaminantes antes de la elución de RstB-His.

Cada fracción se examinó por electroforesis desnaturante en gel de 15 % de poliacrilamida – SDS, empleando como marcador de tallas moleculares el *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* de Promega. Las bandas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie y analizadas por densitometría para determinar el grado de pureza y la talla molecular, mediante el procesador de imágenes *Gene Tools Bioimage system* (Syngene). Se aplicaron 20 µg de proteína total en cada carril. La fracción de RstB-His se obtuvo con un 80 % de pureza.

Todas las fracciones fueron evaluadas por el método de Lowry⁹ para determinar la concentración de proteína, usando albúmina sérica bovina como estándar. En los casos donde fue necesaria la concentración de las fracciones, se realizó la precipitación con ácido tricloroacético en presencia de desoxicolato de sodio.¹⁰

La fracción de RstB-His obtenida por IMAC fue evaluada para medir su actividad de unión a ADNcs, mediante un ensayo de retardo en electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,5 % en disolución estabilizadora TAE (Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 20 mmol/L). Para el ensayo de unión de RstB-His al ADNcs se mezclaron 6 µg de RstB-His con 225 ng de ADNcs del fago VGJf en disolución estabilizadora Tris-citrato 20 mmol/L, glicerol 20 %, EDTA 10 mmol/L, BSA 0,3 µmol/L y en un volumen final de 40 µL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min, se aplicó al gel y se corrió a un voltaje constante de 90 V hasta la salida del colorante a 4 °C. Se utilizó bromuro de etidio (1 µg/mL) para visualizar el ADN mediante la incidencia de luz UV en un transiluminador FBTV-88 (Fisher, EE. UU.).

Para demostrar que la actividad de retardo del ADNcs se debe a la presencia de la proteína RstB-His se evaluó la actividad de esta, después de haber sido inactivada con fenol-cloroformo 1 : 1 (v/v), así como la actividad a una fracción equivalente colectada durante IMAC realizado a un control negativo que consistió en un cultivo de la cepa Top 10 transformada con el plasmidio pBAD/Myc-His C

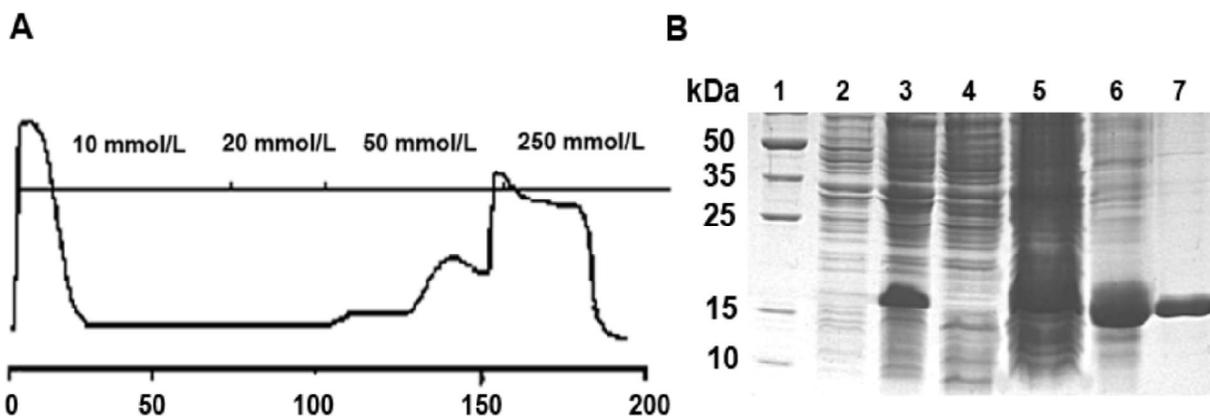


Fig. 1. Purificación de la proteína RstB-His. Panel A: cromatograma de la purificación por IMAC, indicando la concentración de imidazol en la disolución estabilizadora de fosfato de sodio 20 mmol/L; pH 8,0. Panel B: Análisis por SDS-PAGE del proceso de purificación de RstB-His. Carriles: 1) patrón de peso molecular; 2 y 3) extracto de células completas del cultivo antes y después de la inducción; 4 y 5) fracciones soluble e insoluble del extracto celular inducido después de la ruptura celular por sonicación; 6) extracto soluble con urea 8 mol/L de la fracción insoluble del carril anterior; 7) RstB-His obtenida después de la elución con 250 m mol/L de imidazol.

sin el inserto del gen *rstB* (Fig 2). Se observó una marcada diferencia entre la *RstB*-His purificada por IMAC antes y después de ser tratada con fenol-cloroformo, así como también entre ésta y la muestra correspondiente al control negativo, ya que tanto la muestra tratada como la del control negativo no mostraron la capacidad de retardar el ADNcs (Fig. 2).

El protocolo de purificación basado en la solubilización de la proteína con urea, seguido de gradiente de elución para la remoción gradual de la urea, mientras la proteína se mantiene unida a la resina de IMAC, permitió obtener la proteína *RstB*-His, biológicamente activa con un 80 % de pureza y un rendimiento del 29 %. Se

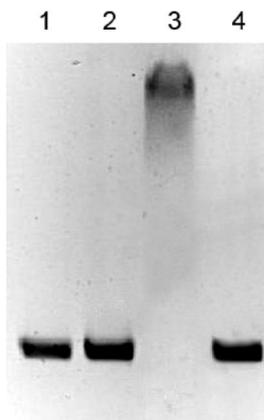


Fig. 2. Actividad biológica de la proteína recombinante *RstB*-His sobre la movilidad electroforética del genoma de simple cadena del fago VGJ ϕ en gel de 0,5 % de agarosa en disolución amortiguadora de pH TAE. Carriles 1) ADNcs en ausencia de *RstB*-His; 2) ADNcs tratado con la fracción colectada en IMAC del control negativo; 3) ADNcs en presencia de *RstB*-His semipurificada por IMAC y 4) igual que el carril anterior pero tratada con fenol-cloroformo.

informa por primera vez la purificación de la proteína *RstB* y se demuestra su capacidad de unión al ADN de simple cadena, función esencial en el ciclo biológico de los fagos filamentosos.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Val M.E., Bouvier M., Campos J., Sherratt D., Cornet F., Mazel D. and Barre F.X. The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio cholerae*. **Molecular Cell**, **19**, 559-566, 2005.
2. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1914, 1996.
3. Maiti D., Das B., Saha A., Ranjan K. Nandy G. Balakrish N. and Rupak K. B. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. **Microbiology**, **152**, 3633-3641, 2006.
4. Davis B.M. and Waldor M.K. Filamentous phages linked to labeled probe, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, virulence of *Vibrio cholerae*. **Curr. Opin. Microbiol.**, **6**, 35-42, 2003.
5. Waldor M.K., Rubin E.J., Pearson G.D., Kimsey H. and Mekalanos J.J. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by region RS2. **Mol. Microbiol.**, **24**, 917-926, 1997.
6. Huber K.E. and Waldor M.K. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. **Nature**, **417**, 656-659, 2002.
7. Campos J., Martinez E., Suzarte E., Rodriguez B.L., Marrero K., Silva Y. *et al.* VGJ ϕ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX ϕ . **J. Bacteriol.**, **185**, 5685-5696, 2003.
8. Colangeli R., Heijbel A., Williams A.M., Manca C., Chan J., Lyashchenko and Gennaro M.L. three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Chromatography B**, **714**, 223-235, 1998.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. A protein measurement with the folin - phenol reagent. **Biol. Chem.**, **193**, 265-275, 1951.
10. Walter J.M. The protein protocols Handbook 2nd edition. Humana Press Inc., Totowa, N.J. 991, 2002