

VII. Ingeniería genética de la toxina del cólera y estudios sobre la relación estructura-función de enterotoxinas.

Joaquín Sánchez¹, Carlos Arias², Rosa Ma. Solórzano¹, Ramón González², Jorge Paniagua³, Armando Isibasi⁴, Jesús Kumate³

¹Instituto Nacional de Salud Pública, ²Instituto de Biotecnología, UNAM, ³Secretaría de Salud, ⁴Instituto Mexicano del Seguro Social

(Recibido, diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

Resumen

En este trabajo describimos manipulaciones genéticas a la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) como un medio para obtener antígenos recombinantes para el desarrollo de vacunas. Se presenta tanto una revisión breve de información publicada como resultados preliminares sobre híbridos obtenidos recientemente. Las proteínas de fusión derivadas de CTB incluyen una que porta un epítipo de la proteína VP4 de rotavirus y otra con un epítipo de la proteína Omp C de *S. typhi*. También se presentan datos preliminares sobre la manipulación genética de dos toxinas relacionadas estructuralmente; la toxina termoestable de *E. coli* enterotoxigénica STI y de la neurotoxina, conotoxina GI, de *Conus geographus*. Las manipulaciones genéticas de estas toxinas comprenden la clonación de la conotoxina GI usando un péptido leader y un promotor heterólogo.

Palabras clave: Toxina del cólera-Subunidad B-Enterotoxina termoestable-Conotoxina-Antígenos recombinantes

Summary

In this report we describe gene manipulations to cholera toxin B-subunit (CTB) as a means to obtain novel antigens for vaccine development. Both, a review of published information on CTB-derived fusion proteins and preliminary data on recently obtained hybrids, are presented. New fusion proteins here described comprise one containing a rotavirus VP4 protein epitope and another with an *S. typhi* OmpC protein epitope. Both epitopes have been successfully cloned at the CTB amino end to give bona fide hybrid proteins. We here also present preliminary data on gene manipulations of two structurally related toxins; the STI heat-stable toxin of enterotoxigenic *E. coli* and the *Conus geographus* neurotoxin, conotoxin GI. Gene manipulations to these last toxin include cloning of conotoxin GI using heterologous leader peptides and promoter signals.

Key words: Cholera toxin B-subunit-Heat-stable enterotoxin-Conotoxin-Recombinant antigens

Mecanismo de acción y estructura molecular de la toxina del cólera. En el cólera, la colonización del intestino delgado por *Vibrio cholerae* resulta en la liberación de la toxina del cólera (CT) por este microorganismo. La toxina tiene un efecto inmediato e irreversible sobre la célula intestinal, causando la pérdida de Na⁺ y Cl⁻ acompañada de agua. El estudio *in vitro* del efecto de CT sobre una gran variedad de células en cultivo, incluidas las de origen intestinal, ha demostrado que el primer suceso medible en las células es el aumento de la concentración de cAMP. Este aumento puede ser hasta de 100 veces mayor que la concentración basal. El efecto de CT se debe a la activación de la adenilato ciclasa y no a una inhibición de la degradación del cAMP por fosfodiesterasas. Por otra parte, la adición

de cAMP al intestino semeja el efecto de la toxina, lo cual apoya la hipótesis de que es el cAMP el mediador del efecto de CT.

La toxina CT esta formada de dos subunidades, una copia de la subunidad A (CTA) y cinco copias de la subunidad B (CTB)¹ (Fig. 1). La subunidad B de 103 aminoácidos forma espontáneamente un pentámero con un poro en su centro² (Fig. 1) en el cual se aloja la subunidad A. La subunidad A interactúa con el pentámero por medio de enlaces no covalentes y a través de su región A2 (ver más adelante).

La subunidad A de 240 aminoácidos está formada por dos regiones llamadas A1 y A2 que son, de hecho, separadas por un corte proteolítico (éste puede ser efectuado por la proteasa misma producida por los

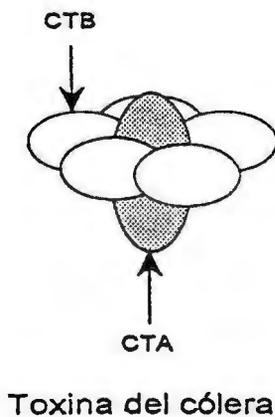


Fig. 1. Estructura polimérica de la toxina del cólera. Se representa la molécula completa de la toxina con los dos tipos de subunidades denominadas CTA y CTB. La subunidad CTB rodea a la subunidad A en la holotoxina.

vibrios). A1 y A2 se mantienen unidas por medio de un enlace disulfuro (Fig. 2). Después de la reducción del enlace disulfuro, el péptido A1, responsable del efecto tóxico sobre la célula intestinal, penetra la membrana y actúa enzimáticamente para romper el sustrato NAD transfiriendo una molécula de ADP-ribosilo al componente Gs-alfa de la adenilato ciclasa³. Existe controversia acerca de cómo la subunidad CTA, o bien el fragmento A1, logra ADP-ribosilar al componente G-alfa-s de la adenilato ciclasa si esta última está asociada a la cara interna de la membrana plasmática. Algunos investigadores proponen que la toxina completa ingresa por endocitosis y que una vez dentro de las vesículas endosomales, CTA es liberada al citoplasma donde es reducida por glucagon citoplásmico^{4,5}. En un modelo semejante se propone que una vez en la vesícula endosomal, la subunidad CTA, aún adherida al endosoma pero con la región A1 expuesta hacia el interior de la célula, es acercada a la proteína G-alfa-s para realizar su ADP-ribosilación⁶.

Otros autores proponen que, al interactuar con la membrana de la célula intestinal, la toxina de cólera sufre un cambio conformacional más o menos profundo en su subunidad B y que esto conlleva a la penetración de la subunidad A. Esta proposición deriva de estudios con membranas artificiales con GM1 en las que se ha observado que la simple unión de CTB, en ausencia de A, causa rearrreglo de las moléculas de GM1 en la superficie de la membrana. Estos estudios parecen apoyados también por el hecho de que GM1 se ha encontrado firmemente asociado al citoesqueleto de la célula. Así, si la interacción de CTB resulta en reacomodo de GM1 y dado que este

último está asociado al citoesqueleto se propone que la unión de CTB sería capaz de inducir cambios en la membrana que facilitarían la entrada de la subunidad A. Sin embargo, hasta en tanto no se tengan mejores evidencias de un papel activo de la subunidad B, tales propuestas deben considerarse especulativas.

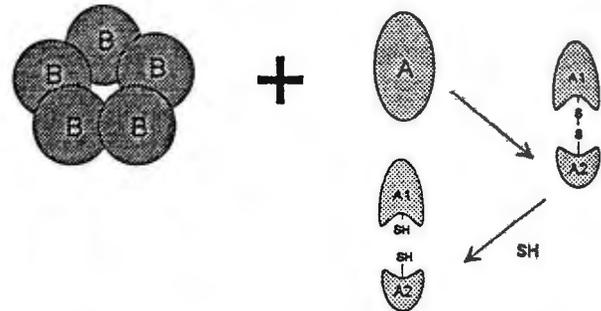


Fig. 2. Disociación de la toxina del cólera. La toxina puede disociarse en un pentámero (complejo 5xB) y la subunidad A (CTA). La subunidad A sufre proteólisis y reducción (SH) después de disociarse del pentámero. Esta proteólisis y reducción separa las dos regiones CTA y los péptidos A1 y A2. Estos péptidos permanecen unidos por un puente disulfuro que puede romperse mediante reducción. La separación de A1 y A2 trae como consecuencia la activación de A1 que a su vez ADP-ribosila al componente G-alfa-s de la adenilato ciclasa en la célula epitelial.

Ingeniería genética de la subunidad B de la toxina de *V. cholerae*. En nuestro laboratorio llevamos a cabo manipulaciones genéticas de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB). Nuestro interés en esta molécula se debe a que es un excelente inmunógeno por la vía oral, completamente inocuo. La CTB puede también ser acoplada a antígenos no relacionados y estimular una respuesta inmune a nivel de mucosas contra esos antígenos cuando se suministra por la vía oral. Esta propiedad no es compartida por otros acarreadores clásicos como la albúmina de suero bovino. A fin de explorar la aplicabilidad de CTB para la generación de vacunas orales en general, decidimos adicionar epítopos foráneos al extremo NH₂ de CTB por medio de ingeniería genética. Para realizar estas manipulaciones introdujimos primero sitios de restricción únicos, a nivel de DNA, en la unión entre el péptido líder y la secuencia CTB madura. Tales sitios son luego empleados para incorporar oligonucleótidos sintéticos con extremos complementarios a las secuencias reconocidas; por ejemplo, por las enzimas SacI y XmaI. La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos insertados es diseñada de manera tal que su adición determina la incorporación en-fase de una cadena corta de aminoácidos al extremo amino de la

proteína CTB. La adición de oligonucleótidos sintéticos a CTB se esquematiza en la Fig. 3.

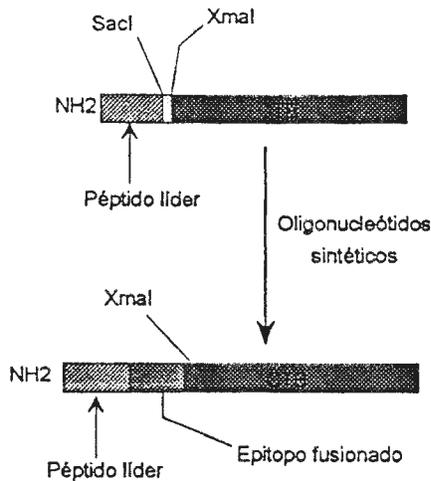


Fig. 3. Inserción de oligonucleótidos sintéticos al gen CTB. En la figura se esquematiza la adición de oligonucleótidos en la frontera entre el péptido líder y la secuencia madura del gen (marcado CTB). La adición de los oligonucleótidos sintéticos resulta en la incorporación de epítipos foráneos de 10 o más aminoácidos al extremo amino de CTB (epítipo fusionado).

Por estos procedimientos hemos logrado añadir a CTB análogos estructurales de la toxina termoestable *STa* de *E. coli* enterotoxigénica y demostrado que CTB puede portar los aminoácidos agregados sin menoscabo aparente de sus propiedades bioquímicas o inmunológicas^{7,8}. Los híbridos generados son inmunogénicos y dan lugar a la formación de anticuerpos, aunque en bajas concentraciones, contra el hapteno fusionado⁹.

Recientemente se logró la fusión de un epítipo de una proteína de cápside externa de rotavirus humano (proteína VP4) al extremo amino de CTB. El péptido fusionado se muestra en la Fig. 4. Este epítipo, una vez unido a CTB y expresado en *E. coli* o *V. cholerae*, es reconocido como anticuerpo monoclonal específico contra él. A su vez, CTB retiene sus características nativas reconociendo a su receptor y reaccionando también contra monoclonales específicos. La proteína híbrida rota-CTB posee propiedades que la convierten en un candidato potencial para el desarrollo de una vacuna oral contra rotavirus en humanos. Por otra parte se creó una proteína derivada de CTB que lleva un péptido, parte de la proteína de membrana externa OmpC de *Salmonella typhi*. La secuencia de ese epítipo también se muestra en la Fig. 4. Estos últimos experimentos son los primeros en una serie dirigida al diseño genético de una vacuna contra la fiebre tifoidea. El epítipo OmpC fusionado se seleccionó

Epítipo VP4 Rotavirus

KAANYQYNYLRDGEQVTA

Epítipo OmpC *Salmonella typhi*

GTSNGSNPST

Fig. 4. Epítipos fusionados al extremo amino de CTB. El epítipo superior forma parte de la proteína de superficie VP4 de rotavirus humano. El epítipo inferior forma parte de la proteína OmpC de *Salmonella typhi* y no se encuentra en OmpC de *E. coli*. Las fusiones genéticas se llevaron a cabo empleando como vector de clonación al plásmido-recombinante pJS752-3⁷.

mediante métodos computacionales de predicción de epítipos para linfocitos B. El epítipo forma parte de OmpC en *S. typhi* pero no de OmpC en *E. coli*.

Construcción de nuevos vectores de clonación para fusiones genéticas a CTB.

a. Vectores mejorados para fusiones al extremo amino de CTB. Para facilitar fusiones al extremo NH2 de CTB, construimos en el laboratorio el plásmido recombinante mejorado pJS752-4. Este plásmido tiene el gen CTB intacto y posee los mismos sitios de restricción que su precursor el plásmido pJS752-3 (Fig. 5). Sin embargo, en el nuevo plásmido causamos

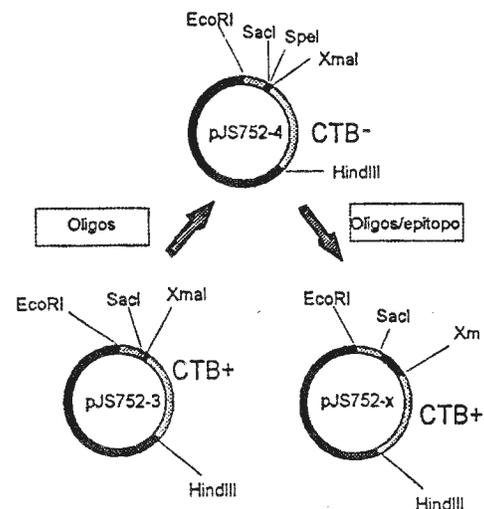


Fig. 5. Construcción del plásmido pJS752-4 para fusiones genéticas al extremo amino de CTB. El plásmido original pJS752-3 determina un fenotipo CTB+. Al insertar los oligonucleótidos sintéticos indicados se obtiene el plásmido pJS752-4. Este plásmido determina un fenotipo CTB-. La inserción de oligonucleótidos, para lograr la fusión al extremo amino de CTB de los epítipos de interés, resulta en plásmidos, en los cuales se restituye de nueva cuenta el fenotipo CTB+ (pJS752-x).

la terminación prematura de la traducción del gen CTB. Esto determina un fenotipo CTB-. Al insertar oligonucleótidos sintéticos que codifican para los epítomos foráneos se restituye el fenotipo CTB+. Tal estrategia permite el monitoreo de proteínas de fusión mediante la detección de CTB y no necesariamente mediante la detección del epítomo agregado. De esta forma se puede hacer un tamizaje de colonias recombinantes, las cuales deben dar reacción positiva para CTB. La detección de CTB se hace rutinariamente por ELISA, técnica muy simple y accesible. Estamos elaborando también una técnica que permitirá diferenciar directamente en las cajas de agar a aquellas colonias con la proteína híbrida de un fondo de colonias que llevan el plásmido sin inserción.

Creemos que el plásmido pJS752-4 será de utilidad sobre todo en el caso de que se fusionen epítomos que requieren de detección con antisueros que representan riesgos para el investigador, como es el caso de la detección de proteínas híbridas con péptidos derivados del virus del SIDA. Aquí, a menudo, parece que la única alternativa para la caracterización inicial de las recombinantes es por reacción inmunológica con suero de pacientes HIV-positivos. Con el plásmido pJS752-4 se evita este paso, pues basta con determinar el fenotipo CTB+ para seleccionar las recombinantes que expresan a las proteínas híbridas. Una vez identificadas aquellas clonas de interés se puede proceder a corroborar la presencia del epítomo deseado usando los sueros de pacientes, ahora bajo las condiciones de seguridad biológica necesarias.

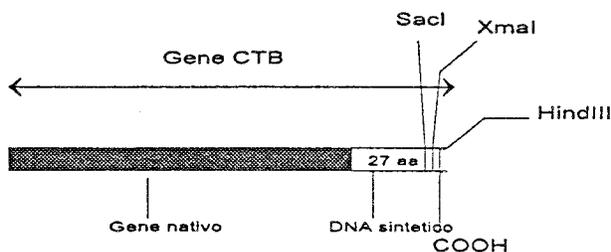


Fig. 6. Representación esquemática del gen CTB en los vectores de clonación para fusiones al extremo carboxilo de CTB. El gen fue modificado mediante la sustitución de la secuencia nucleotídica que codifica para los últimos 27 aminoácidos de la cadena por oligonucleótidos sintéticos ad hoc. Se señalan el gen CTB, su extremo carboxilo (COOH), los sitios de restricción relevantes, el gen nativo y la región sustituida por DNA sintético.

b. Vectores mejorados para fusiones al extremo carboxilo de CTB. Después de nuestros primeros

estudios sobre fusión de análogos a la toxina STa al extremo amino de CTB, encontramos evidencia que sugería que para ciertas construcciones genéticas era necesario dejar libre el extremo carboxilo de CTB. Para este fin, al extremo carboxilo del gen se añadieron oligonucleótidos sintéticos para reemplazar los codones para los últimos 27 aminoácidos por codones alternos que no modificasen la secuencia primaria de la proteína, pero que permitiesen crear sitios de restricción únicos (Sacl y XmaI) para inserciones en el extremo carboxilo de CTB (Fig. 6).

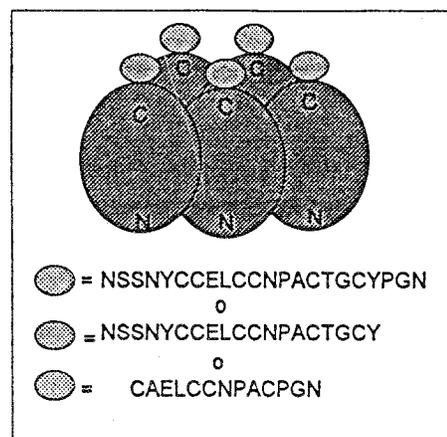


Fig. 7. Secuencias de aminoácidos unidos al extremo carboxilo de CTB. Se representan las secuencias agregadas a la molécula como pequeñas esferas sobre el extremo carboxilo de (C) cada una de las subunidades. Se indica también la posición del extremo amino (N) de cada subunidad. Se muestran las secuencias individuales por medio de los símbolos de una sola letra para cada aminoácido. Todas las secuencias mostradas están relacionadas a la enterotoxina termoestable STI de *E. coli* enterotoxigénica.

Una vez creado el vector para clonación en el extremo carboxilo de CTB se fusionaron al gen oligonucleótidos sintéticos de doble cadena con extremos complementarios a los sitios de restricción Sacl y XmaI. Las secuencias fusionadas correspondieron a péptidos relacionados a la enterotoxina termoestable de *E. coli* enterotoxigénica STa. En la Fig. 7 se muestran tres secuencias unidas al extremo COOH de CTB usando el vector de clonación mencionado. La secuencia más corta (de 10 aa) es un péptido análogo que no es tóxico pero es reconocido por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la toxina STI. Las secuencias más largas contienen la secuencia completa de la toxina STI.

El péptido más largo tiene en su extremo carboxilo la secuencia PGN. Esta extensión de tres aminoácidos impedía el reconocimiento del péptido por un monoclonal específico (Mab 27:3). El péptido cuya secuencia termina en Tirosina (Y), que corresponde a

la secuencia de STI nativa sí fue, sin embargo, reconocido por dicho anticuerpo⁹. Estos hallazgos confirmaron nuestra hipótesis de que, por lo menos para los péptidos aquí fusionados, para logra exposición adecuada de ciertas regiones antigénicas, es indispensable dejar su extremo COOH libre. Las modificaciones al gen CTB aquí descritas ofrecen ahora la alternativa de crear proteínas híbridas con epitopos cuyo extremo COOH esté libre. Estos resultados llaman la atención al hecho de que cuando se diseñen proteínas de fusión para inmunizaciones se debe mantener siempre en mente que tal vez sea necesario, para el reconocimiento inmunológico adecuado de esos epitopos, colocarles en el extremo carboxilo de la proteína, de tal suerte que ellos mantengan su propio extremo COOH libre.

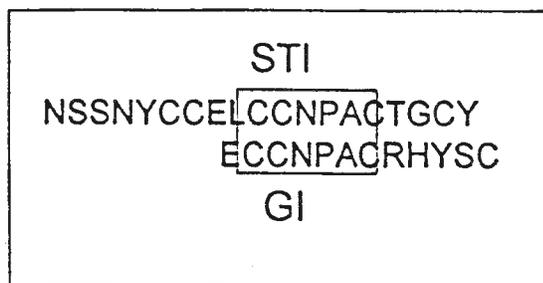


Fig. 8. Homología entre las secuencias de aminoácidos de la enterotoxina STI y conotoxina GI. Se muestran las secuencias de la enterotoxina STI en la parte superior (STI) y de la conotoxina GI (GI) en la parte inferior. Las secuencias se presentan usando la simbología de una sola letra para cada aminoácido. En el recuadro se encuentran los seis residuos idénticos en las dos moléculas.

Estudios sobre la relación estructura-función de la enterotoxina STI y toxinas homólogas. Además del proyecto arriba descrito, que se considera la línea principal del laboratorio, llevamos a cabo investigaciones orientadas a esclarecer la relación estructura-función de la enterotoxina termoestable de *E. coli* STI. Aquí realizamos en primer lugar la clonación de una toxina con gran homología estructural a STI. Esta toxina denominada conotoxina GI es elaborada por un caracol marino de la especie *Conus geographus*¹⁰.

Como puede verse en la Fig. 8, una secuencia de seis aminoácidos es idéntica en ambas toxinas. Es de notar que a pesar de esta gran relación estructural, las toxinas tienen funciones muy distintas, pues mientras la toxina STI causa diarrea en el ser humano (y en animales experimentales) la conotoxina es una neurotoxina que causa parálisis flácida en peces y en ratones. Esta disparidad de funciones con un grado tan significativo de homología estructural nos llamó

poderosamente la atención y nos llevó a tratar de crear mutantes para buscar una explicación sobre la aparente coincidencia en la secuencia aminoacídica. Planeamos reemplazar aminoácidos, en ambas toxinas por separado, fuera de la zona de homología, de manera que a la conotoxina GI le colocáramos residuos que forman parte de la enterotoxina STI y a STI le colocáramos residuos presentes en conotoxina GI. Mediante este ejercicio pretendemos determinar si existen aminoácidos clave que determinen la función de neurotoxina en un caso y de enterotoxina en el otro. Nuestra hipótesis de partida es que existen al menos dos dominios estructurales. La zona homóloga sería uno de esos dominios, mientras las zonas no homólogas (a ambos lados de la zona homóloga) formarían el otro dominio. La zona homóloga puede determinar el reconocimiento de su receptor o, alternativamente, puede ser indispensable para la acción de la toxina sobre su blanco específico. En este último caso serían los aminoácidos no homólogos los responsables del reconocimiento del blanco específico.

A la fecha hemos clonado ya un gen sintético que codifica para conotoxina GI y lo hemos expresado en *E. coli*. No hemos logrado todavía la recuperación de conotoxina GI activa de *E. coli*, posiblemente debido a que la conotoxina fue unida a un péptido líder corto. Creemos que este péptido líder corto impide ya sea el doblaje correcto de la conotoxina GI o dificulta su transporte al periplasma de la célula; o bien, que pudiera tener ambos efectos.

Las manipulaciones genéticas programadas para lograr la expresión adecuada de conotoxina GI incluyen colocarle el péptido líder de STI. Esto dará información sobre si se comparten los mecanismos biológicos de doblaje y secreción por las dos toxinas. Hay evidencia de otros sistemas que indican que éste pudiera ser el caso. Lograr la expresión de GI activa en *E. coli* será un paso significativo, que permitirá proceder a crear mutantes en los aminoácidos no homólogos para obtener información sobre el papel de esas zonas en la función biológica de ambas toxinas. Nuestra meta es llegar a definir el dominio de acción de la enterotoxina STI para profundizar en el estudio del mecanismo fino de su acción en el intestino. Esto podría dar como producto final el diseño de efectores biológicos (análogos) o farmacológicos para evitar el efecto de esta toxina en el ser humano.

Agradecimientos. J. Sánchez recibe del Grupo VISA, y a través de la Secretaría de Salud, una beca especial de apoyo a la biología molecular. Se agradece el apoyo de CONACyT a JS para la realización de parte del trabajo aquí reportado (Proyecto 0672-M9109). JK, AI, CA, JP y JS son miembros del Sistema Nacional de Investigadores.

Referencias

- 1.- Holmgren J., Lonnroth I. Oligomeric structure of cholera toxin. *J Gen Microbiol* 1975;86:49-65.
- 2.- Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BAM, Witholt B, Hol WGJ. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli* *Nature* 1991;351:371-7.
- 3.- Gill DM. The mechanisms of action of cholera toxin. *Adv Cyclic Nucleot Res* 1977;8:85-118.
- 4.- Wisniewski BJ, Bramhall JS. Photolabelling of cholera toxin subunits during membrane penetration. *Nature* 1981;289:319-21.
- 5.- Moss J y Vaughan M (Eds). ADP-ribosylating toxins and proteins. American Society for Microbiology, Washington, 1990.
- 6.- Janicot M, Fouque F, Desbuquois B. Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *J Biol Chem* 1991;266:12858-65.
- 7.- Sanchez J, Svennerholm AM, Holmgren J. Genetic fusion of a non-toxic heat stable enterotoxin-related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. *FEBS Lett* 1988;241:110-4.
- 8.- Sanchez J, Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1989;86:481-485.
- 9.- Sanchez J, Johansson S, Lowenadler B, Svennerholm AM, Holmgren J. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res Microbiol* 1990;141:971-9.
- 10.- Olivera BM, Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie AE, Woodward SR, Hillyard DR, Cruz LJ. Diversity of conus neuropeptides. *Science* 1990;249:257-63.