



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

00591

9

28/2/01

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Control de la expresión y actividad de
los reguladores de virulencia ToxR
y ToxT de *Vibrio cholerae* El Tor.

T E S I S

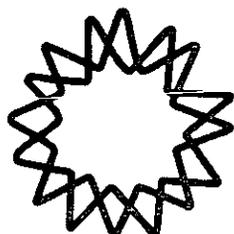
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

ANA IMELDA MEDRANO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOAQUIN SANCHEZ CASTILLO



CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*La investigación científica: la única forma
de poesía que el Estado retribuye.*

Jean Rostand
Biólogo y escritor francés
(1894-1977)

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Joaquín Sánchez Castillo, una parte cuando éste se encontraba en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) y el resto en su situación actual, dentro de la Unidad de Investigación Biomédica Molecular (UNIBIMOL) de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en Cuernavaca, Morelos. Una parte del proyecto se realizó, también, durante 3 estancias cortas, en el laboratorio del Dr. Victor DiRita, en la Universidad de Michigan, en Ann Arbor, MI, USA.

Este trabajo fue asesorado por el siguiente comité tutorial:

Dr. Joaquín Sánchez Castillo (Director de tesis)

Dr. José Luis Puente García

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Edmundo Calva Mercado

Durante el desarrollo del trabajo fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 93828). Para la realización del trabajo se recibió apoyo de los proyectos SPEVACC-HN-01 (SAREC-SIDA, Suecia, al Dr. J. Sánchez) y Public Health Service grant AI 31645 (National Institutes of Health, al Dr. V.J. DiRita).

AGRADECIMIENTOS:

Al Ser Supremo, por permitirme existir y resistir.

A mi familia por su cariño y apoyo constante, porque sin ustedes no tendría la fuerza suficiente para superar los obstáculos de la vida y de los estudios. Los quiero mucho.

A mis amigos del alma: Bolen, Laura, Alma, Roberto, Mando, Yadi y Karen, porque aunque no siempre nos entendamos a la perfección están ahí, con una palabra de aliento y de cariño para mí. Porque, cerca o lejos, están en mi corazón como uno de mis tesoros más preciados.

A Joaquín, porque más que mi maestro y guía durante todo este tiempo de formación has sido un gran apoyo, un muy querido amigo.

A los miembros del honorable jurado: Dr. Alejandro Alagón, Dr. Joaquín Sánchez, Dr. José Luis Puente, Dr. Lorenzo Segovia, Dr. Federico Sánchez, Dr. Guillermo Gosset y Dr. Enrique Merino, por tomarse un tiempo para revisar este trabajo e iluminarme con su acertada asesoría y crítica del mismo.

A Delta y Lety, por su compañía siempre agradable en el laboratorio.

A José Luis, por tu amistad y ayuda en el embellecimiento de este escrito y en la preparación de la presentación de este trabajo.

A ti, que ahora sostienes este trabajo, espero que lo que aquí encuentres te sea de utilidad.

GRACIAS.

DEDICATORIAS:

A la semilla que murió para que fructificáramos.
Papi, te quiero y te extraño.

A mi mami y la flaca (Nane), mis mejores amigas siempre.
Diego, Verónica, Berenice y Dieguito... me encanta ser tía!
Jorge, Roberto y Juan, aunque no somos tan expresivos,
de que hay cariño, lo hay. Jorge B., no te me olvidabas, cuñis.
Ustedes son lo mejor que hay en mi vida.

Al amor... el motor de mi vida.

Quiéranlo o no, el edificio del amor humano, con todo lo que esta palabra implica de bestialidad y sublimación, furor y sacrificio, con todo lo que significa de ligero, emocionante o terrible, está construido sobre unas mínimas diferencias moleculares de algunos derivados del fenantreno.

Jean Rostand

INDICE

	PAGINA
I.- RESUMEN	i
II.- ABSTRACT	iv
III.- INTRODUCCIÓN	1
El cólera, historia y dispersión	2
Características generales de <i>V. cholerae</i>	3
La toxina de cólera	4
Regulación de factores de virulencia en <i>V. cholerae</i>	5
El regulón ToxR	5
Genes modulados directamente por ToxR	7
ToxS en la actividad de ToxR	9
Participación de ToxT en el regulón ToxR	10
Papel de H-NS en la regulación del regulón ToxR	14
Regulación específica entre los dos biotipos de <i>V. cholerae</i> O1	15
IV.- OBJETIVOS	18
V.- MATERIALES Y METODOS	20
Cepas Bacterianas	21
Condiciones de crecimiento	22
Aislamiento de RNA y ensayos de "Primer Extension" (P.E.)	23
RT-PCR de transcrito para <i>toxT</i>	24
Inmunodetección de ToxR	25
Inmunodetección de TcpA	27
Detección de CT	28
Clonación del gen <i>toxT</i> en el plásmido pMMB66EH	29
Cultivos con variaciones en las condiciones de crecimiento AKI	30
Cultivos con las cepas VJ739 (pMT5) y VJ739 (pToxT ET)	30

VI.- RESULTADOS	32
Crecimiento de <i>V. cholerae</i> El Tor bajo condiciones AKI y no-AKI	33
Expresión de <i>toxT</i> y <i>ctxAB</i> en <i>V. cholerae</i> El Tor	33
Detección de la proteína ToxR	36
RT-PCR para <i>toxT</i> como indicador de la presencia de un RNAm largo	36
Inmunodetección de TcpA	39
Producción de CT en cultivos con variaciones en las condiciones de crecimiento AKI	41
La agitación influye en la producción de CT	45
VII.- DISCUSIÓN	47
VIII.- CONCLUSIONES	59
IX.- PERSPECTIVAS	61
X.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
XI.- ANEXO	71

TABLAS	PAGINA
I.- Tabla 1 Diferencias entre ambos biotipos de <i>V. cholerae</i> O1	4
II.- Tabla 2 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	21
III.- Tabla 3 Determinación de CT en sobrenadantes de cultivo de la cepa E7946 en crecimiento con variaciones en las condiciones AKI	44
 FIGURAS	
III.- Figura 1 Comparación de las secuencias nucleotídicas de los promotores modulados por ToxR	8
IV.- Figura 2 Modelo de regulación de ToxT en <i>Vibrio cholerae</i>	13
V.- Figura 3 Modelo para la modulación negativa de la expresión de genes de virulencia ejercida por H-NS	16
VI.- Figura 4 Secuencia de oligos para la amplificación del gen <i>toxT</i>	26
VII.- Figura 5 Curvas de crecimiento de <i>V. cholerae</i> E7946 bajo condiciones AKI y no-AKI	34

VIII.- Figura 6	
Expresión de <i>toxT</i> y <i>ctxAB</i> y producción de CT de <i>V. cholerae</i> E7946 crecida en condiciones AKI	35
IX.- Figura 7	
Expresión de <i>toxT</i> y <i>ctxAB</i> de <i>V. cholerae</i> E7946 en crecimiento estático prolongado	37
X.- Figura 8	
Inmunodetección de ToxR en <i>V. cholerae</i> E7946 crecido en condiciones AKI	38
XI.- Figura 9	
Detección por RT-PCR de un transcrito para <i>toxT</i>	40
XII.- Figura 10	
Inmunodetección de TcpA por "dot- blot"	42
XIII.- Figura 11	
Western Blot para TcpA de <i>V. cholerae</i> E7946 en crecimiento estático prolongado	43
XIV.- Figura 12	
Producción de CT por la cepa VJ739 (pMT5)	46
XV.- Figura 13	
Modelo hipotético para la función de ToxR y ToxT en la respuesta de <i>V. cholerae</i> El Tor a las condiciones AKI	50

RESUMEN

La bacteria *Vibrio cholerae* El Tor requiere de condiciones especiales de cultivo *in vitro* para expresar sus factores de virulencia, como la toxina de cólera (CT) y el pilus (fimbria) corregulado con la toxina (TCP). Estas son las condiciones denominadas AKI, y consisten de un período inicial de crecimiento estático (sin agitación) seguido por agitación.

El regulador ToxT activa la expresión de *ctxAB* y *tcpA*, genes que codifican para la producción de la CT y el TCP respectivamente, y su transcripción inicial depende del regulador ToxR. Para entender el control de la síntesis de la CT y el TCP en los vibrios El Tor, se monitoreó la transcripción de *toxT* y *ctxAB* por medio de experimentos de "primer extension" a lo largo de una curva de crecimiento.

Las condiciones AKI estimularon la síntesis de la CT, encontrándose ausencia de transcripción de *ctxAB* durante el crecimiento estático pero una inducción de ésta al iniciar la fase de agitación. La transcripción inicial de *toxT* se indujo al final del período de crecimiento estático y fue transitoria, ya que se detuvo poco después de iniciada la agitación. Los ensayos de inmunodetección mostraron que los niveles de ToxR no fueron igualmente transitorios, lo que implica que la expresión transitoria de *toxT* puede deberse a un mecanismo de encendido/apagado de la actividad de ToxR.

A pesar de la activación transitoria de *toxT* por ToxR, la transcripción de *ctxAB* se mantuvo durante la agitación. Este hallazgo sugirió una expresión continua de *toxT*, posiblemente a través de transcripción de relevo desde el promotor de *tcpA*, que se encuentra a 12.6 kb de distancia río-arriba. Esta propuesta se apoya en el aumento de la producción de TcxA durante la fase de agitación del cultivo. La transcripción de *toxT* desde el promotor de *tcpA* es además compatible con la evidencia de un mensajero para *toxT*, detectado por RT-PCR, en muestras tomadas después de que se detuvo la transcripción dependiente de ToxR. Interesantemente, esto representa una forma de auto-retroalimentación positiva para *toxT* ya que la expresión de *tcpA* es inducida por ToxT mismo.

La inducción de *tcpA* no sucede a la par que la de *ctxAB*, ya que en cultivos en crecimiento estático prolongado se produce TcxA una vez que aparece el transcrito

para *toxT*, y sus niveles permanecen constantes durante la curva de crecimiento. La transcripción de *ctxAB*, por el contrario, es dependiente de la agitación del cultivo. La observación de que la cepa mutante *ToxT⁻* de *V. cholerae* El Tor transformada con un plásmido que expresa *toxT* produjo mucho mejores niveles de CT cuando fue crecida en agitación desde el inicio del cultivo que en crecimiento estático, apoya un efecto fundamental de la agitación en la inducción de *ctxAB*.

Por lo tanto, proponemos para *ToxT* un mecanismo de activación similar al de *ToxR*, en el que la fase de agitación en los cultivos tipo AKI induce en *ToxT* un cambio en actividad que es equivalente a un "switch" de encendido/apagado. Este "switch" regularía su actividad sobre el promotor de *ctxAB* y sería esencial para la síntesis de CT, pero no indispensable para la expresión de *tcpA*.

ABSTRACT

Vibrio cholerae El Tor require special *in vitro* culture conditions to express virulence factors, such as cholera toxin (CT) and toxin co-regulated pili (TCP). These conditions, termed AKI, consist of an initial static growth period (without shaking) followed by shaking.

The ToxT regulator positively modulates *ctxAB* and *tcpA* expression, the genes encoding for CT and TCP respectively, and its initial transcription depends on the ToxR regulator. To help understand the control of CT and TCP synthesis in the El Tor vibrios, *toxT* and *ctxAB* transcription was monitored by primer extension, throughout a growth curve.

AKI conditions stimulated CT synthesis with lack of *ctxAB* transcription during static growth but with a clearly induction upon shaking. Initial *toxT* transcription was induced at the end of the static growth period and was transient, stopping shortly after shaking. Immunoblot assays showed that ToxR levels were not similarly transient. This implies that transient *toxT* transcription is due to an on/off switch mechanism for the activity of ToxR.

Despite the transient ToxR dependent *toxT* transcription, *ctxAB* transcription was sustained during the shaking period. This finding suggested continuous *toxT* expression, possibly through relay transcription, from the *tcpA* promoter located 12.6 Kb upstream. This proposal is supported by increased TcpA protein expression during the shaking phase of the culture. Readthrough *toxT* transcription from the *tcpA* promoter is compatible with evidence from RT-PCR experiments that show a *toxT* message after ToxR dependent transcription had stopped. Interestingly, this represents a positive feedback mechanism for *toxT*, since *tcpA* expression is induced by ToxT.

Both genes, *tcpA* and *ctxAB*, are not equally induced, since there is TcpA production in static growth cultures once the *toxT* transcript appears, and protein levels remain constant during the growth curve. On the contrary, *ctxAB* transcription is dependent on the shaking phase of the culture. A major effect of shaking on *ctxAB* induction is supported by the observation that the *V. cholerae* El Tor ToxT

mutant strain, transformed with a *toxT* expressing plasmid, produced higher CT levels when grown shaking from the beginning of the culture than in static growth.

Therefore, similar as for ToxR, we propose an on/off switch mechanism for ToxT activation. In summary, we suggest that, in AKI cultures, the shaking phase induces a change on ToxT activity equivalent to an on/off switch. This switch would regulate its activity on the *ctxAB* promoter and would be essential for CT synthesis, but not for *tcpA* expression.

INTRODUCCION

El cólera, historia y dispersión

El cólera, frecuentemente llamado cólera asiático o cólera epidémico, es una enfermedad diarreica grave ocasionada por el patógeno *Vibrio cholerae* O1. *V. cholerae* O1 se diferencia de las enterobacterias por ser oxidasa (+), y se subdivide en dos biotipos: clásico y El Tor, y tres serovares (o serotipos): Ogawa, Inaba e Hikojima. La enfermedad se adquiere por medio del consumo de agua o comida contaminada, con una ingestión mínima promedio de 1×10^8 bacterias y un período máximo de incubación de 5 días. En este período, *V. cholerae* coloniza el intestino delgado.

La enfermedad se caracteriza por el inicio inesperado de diarrea profusa. El paciente puede perder, en un día o dos, varios litros de líquido que contiene electrolitos, bicarbonatos y iones. Esta pérdida de líquido conlleva a la deshidratación, anuria, acidosis y eventualmente, shock. Las evacuaciones contienen escamas de moco y células epiteliales, dando el aspecto de heces en "agua de arroz", así como grandes cantidades de vibrios. La pérdida de potasio puede dar como resultado complicaciones cardíacas y problemas circulatorios. La tasa de mortalidad puede ser alta (50-60%) en los casos de cólera no tratado.

El cólera se ha presentado de forma endémica en el subcontinente hindú durante siglos. El cólera epidémico fue descrito en 1563 por García del Huerto, un médico portugués en Goa, India. John Snow, un médico londinense, probó en 1849 que el agua contaminada puede ser una vía de transmisión del cólera. Robert Koch, en 1884, aisló al vibrio a partir de las descargas intestinales de pacientes con cólera y comprobó que la bacteria era el agente causal de la enfermedad.

El primer brote de cólera en Europa y América empezó en 1817, y para inicios del siglo XX se habían presentado seis oleadas de cólera a través del mundo. Desde entonces y hasta los años 60s, la enfermedad se localizó y está presente en el sur de Asia. En 1961, el cólera de biotipo El Tor resurgió produciendo una epidemia mayor en las Filipinas, iniciando la 7ª pandemia. Las cepas de biotipo El Tor reemplazaron a las cepas clásicas entre los años de 1969 y 1974 en el Delta del Río Ganges, en la India. Desde entonces, este biotipo se ha dispersado a través de

Asia, el medio oriente, Africa y más recientemente, algunas partes de Europa y América.

Hay ciertas características de las cepas El Tor que le confieren un alto grado de "virulencia epidémica" permitiéndole dispersarse a través del mundo. Primero, existe una mayor proporción de casos asintomáticos (portadores) que en el caso de cólera clásico. Segundo, el tiempo de eliminación de bacterias por vía fecal después de la infección es mayor para las cepas El Tor que para las cepas clásicas. Tercero, las cepas El Tor sobreviven por períodos más largos en el ambiente extraintestinal (3,37).

Características generales de *V. cholerae*

Vibrio cholerae O1 es una bacteria Gram-negativa y al igual que otros miembros del género *Vibrio*, es un anaerobio facultativo que no forma esporas, muy móvil y tiene forma de bacilo curvo, con una longitud de 1.4 a 2.6 mm (3).

Existen 139 serogrupos de *V. cholerae* clasificados del O1 al O139. Sólo los vibrios del serogrupo O1, y más recientemente el serogrupo O139 (67), se han asociado con epidemias y pandemias de cólera. La habilidad para producir toxina de cólera es determinante para la virulencia de las bacterias de esos serogrupos (3).

V. cholerae O1 en base a sus características fenotípicas se divide, a su vez, en dos biotipos: clásico y El Tor. La diferenciación entre ambos biotipos no es necesaria para el control o tratamiento de los pacientes, pero puede tener importancia epidemiológica o de salud pública. Cada biotipo se identifica en el laboratorio en base a sus reacciones a ciertas pruebas bioquímicas, como lo son: la prueba de Voges Proskauer (VP, modificada con NaCl al 1%, para los vibrios); la sensibilidad al antibiótico Polimixina B (50 U) y su capacidad para aglutinar eritrocitos de pollo, cabra o borrego (Tabla 1) (3).

Tabla 1. Diferencias entre ambos biotipos de *V. cholerae* O1

Biotipo	VP (modificado con NaCl 1%)	Sensibilidad a Pol B (50 U)	Hemaglutinación
clásico	(-)	(+)	(-)
El Tor	(+)	(-)	(+)

Para colonizar el intestino humano y establecer una infección, *V. cholerae* expresa un grupo de factores de virulencia que incluyen a la toxina de cólera (CT), las fimbrias (pili) correguladas con la toxina (TCP), proteínas de membrana externa que se consideran importantes para la colonización, así como también el denominado factor de colonización accesorio (ACF) (54).

Ciertos estímulos ambientales afectan el control de la expresión de genes que codifican para los factores de virulencia en *V. cholerae* (60). Se ha propuesto que esta regulación tiene como función optimizar el gasto de energía y así lograr una infección exitosa. Uno de los factores de virulencia considerado quizá el más importante en *V. cholerae* es la CT porque ocasiona la pérdida abundante de líquido, aún si se suministra en forma pura y en ausencia de la bacteria. Se cree que las evacuaciones abundantes que caracterizan al cólera son principalmente producto de la acción de la CT.

La toxina de cólera

La toxina de cólera pertenece a una familia de enterotoxinas relacionadas estructural y funcionalmente y consiste de dos tipos de polipéptidos: la subunidad A y la subunidad B. El análisis molecular de la CT ha revelado que ésta consiste de 5 copias de la subunidad B que rodean a la subunidad A para formar una holotoxina.

La subunidad A en la holotoxina no es una cadena continua debido a que la proteína es procesada post-traduccionalmente y es fragmentada proteolíticamente en dos polipéptidos denominados A₁ y A₂. La subunidad A₁ es la responsable del efecto citotóxico, causando ADP-ribosilación del complejo adenilato ciclasa (31).

El modelo de acción de la CT propone que la subunidad B lleva a cabo la unión de la holotoxina a un receptor en la célula de epitelio intestinal, y que la subunidad A, a través de su actividad enzimática específica, actúa intracelularmente y causa alteración en el transporte iónico. El receptor identificado para la CT es el gangliósido GM1, que está presente en las células de la mucosa intestinal (31).

Los genes que codifican para las subunidades A y B se encuentran dentro de un mismo operón denominado *ctxAB*, que recientemente se descubrió forma parte del genoma de un fago filamentoso lisogénico llamado CTX ϕ , y cuyo ciclo vital incluye su integración a uno, o ambos (en cepas clásicas), de los cromosomas del vibrio (66,68).

El operón *ctxAB* posee una región promotora propia, la cual es regulada positivamente por la proteína ToxR, codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 1 del vibrio (66). Además, la expresión de *ctxAB* es inducida por otra proteína reguladora llamada ToxT, que forma parte de otro fago (ver adelante). Esto sugiere que el promotor de *ctxAB* posee sitios reguladores para dos activadores que al parecer no están relacionados a nivel estructural (11).

Regulación de factores de virulencia en *V. cholerae*

El regulón ToxR

La producción de toxina en *V. cholerae* es aparentemente parte de una respuesta al medio ambiente en el que se encuentra, y que se acompaña de la producción de otros factores de virulencia, que también son modulados y de forma coordinada, por el regulador ToxR (11,14,49,63). El hecho de que las cepas con

mutaciones que anulan la producción de ToxR son deficientes en la producción de factores de virulencia y, por tanto, avirulentas, comprueba la importancia de la función de ToxR en esta respuesta (53). El conjunto de genes controlados por ToxR se denomina el regulón ToxR (54).

Se ha propuesto que ToxR, que es una proteína de membrana interna, puede responder a cambios externos en osmolaridad, nutrientes y pH, pero no se sabe a través de qué mecanismo (13). ToxR tiene un tamaño aproximado de 32 kDa y aparentemente posee tres módulos funcionales: uno en la región amino terminal, con localización citoplásmica y que se considera el módulo de unión a DNA; otro módulo que es transmembranal, sencillo e hidrofóbico; y un módulo carboxilo terminal localizado en el periplasma, que parece ser el dominio de dimerización (u oligomerización) (18). La región amino terminal de ToxR es homóloga al módulo carboxilo terminal del regulador de la expresión de porinas en *E. coli*, OmpR, el cual contiene al sitio de unión y activación del DNA (43). La semejanza de ToxR con OmpR, que pertenece al sistema de activadores de dos componentes, hace pensar que ToxR tiene un mecanismo de acción semejante pero aún no hay evidencia fuerte para apoyar esta propuesta (40).

En un sistema de dos componentes típico, al cual podría pertenecer ToxR, una proteína cinasa asociada a la membrana responde a señales ambientales y fosforila a la proteína reguladora de respuesta. No obstante, ToxR no posee una región consenso que funcionase como el sitio aceptor de fosfatos, así como tampoco se ha obtenido evidencia para la existencia de una cinasa asociada a la activación o desactivación de ToxR (18).

ToxR parece estar más relacionado a la subfamilia de proteínas similares a OmpR a la que pertenecen las proteínas de membrana CadC y PsaE. CadC regula la expresión de lisina descarboxilasa en *E. coli*, mientras PsaE regula la expresión de fimbrias en *Y. pestis*. También podrían ser consideradas parte del mismo grupo los homólogos de ToxR en diferentes especies de *Vibrio*, así como el regulador TcpP de *V. cholerae*, el cual es clave para controlar la expresión de varios factores de virulencia. La proteína HilA, que regula la expresión de genes de invasión en

S.typhimurium, es también homóloga a ToxR a nivel de secuencia; sin embargo, a diferencia de ToxR, parece no ser una proteína de membrana (18). Independientemente de los análisis de semejanza estructural de ToxR con otros reguladores, este regulador comparte con ellos algunos aspectos funcionales.

Aún cuando no está claro cómo se lleva a cabo la activación de ToxR, se cree que su forma activa es un dímero. Para sondear esta propuesta, Dziejman y colaboradores (1994) construyeron proteínas quiméricas con la región amino terminal del represor del fago lambda (λ) unida a la región de ToxR que incluye las porciones transmembranales y periplásmicas. Ya que la forma activa del represor de λ depende de su dimerización, el hecho de que las proteínas quiméricas λ -ToxR fueron capaces de reprimir una fusión reportera con un operador lambda en *E.coli*, apoya fuertemente que ToxR forma dímeros y que las regiones citoplásmica y/o transmembranal de ToxR son suficientes para promover la dimerización y quizá aún la formación de oligómeros (17).

Genes modulados directamente por ToxR

ToxR es capaz de modular directamente a cuatro genes diferentes a través de unión a sus respectivos promotores. ToxR se une y estimula positivamente la transcripción del operón *ctxAB*, del promotor cercano de *toxT* y del promotor de *ompU*, que codifica para una proteína de membrana que se ha identificado como un posible factor de adherencia de *V. cholerae* (10). Por otra parte, la unión de ToxR al promotor de *ompT*, gen que codifica para otra proteína de membrana de tipo porina, tiene efecto negativo sobre su transcripción (39). Para tratar de determinar si existen características comunes entre los 4 promotores modulados por ToxR se han realizado análisis de protección a digestión con DNasa I ("footprinting") de los distintos promotores, y tal parece que las únicas características que comparten son el ser regiones relativamente extensas y ricas en A+T (Fig 1). Se predice que el DNA con secciones ricas en residuos de A se encuentra doblado y se ha estipulado que ToxR puede reconocer regiones de DNA distorsionado (10,39). Por ello, se propone que ToxR reconoce alguna característica estructural del DNA, y no una secuencia nucleotídica específica.

En la región promotora de *toxT* se han localizado tres regiones con secuencias repetidas invertidas, y se ha identificado como el sitio de unión de ToxR la mitad de la repetida invertida centrada en la posición -87 con respecto al inicio de la transcripción (Fig 1) (25,39). La presencia del heptámero TTTTGAT en el promotor de *ctxAB* es esencial para la unión de ToxR y se encuentra repetido en tándem. El número de copias del heptámero es variable y puede repetirse de 3 a 8 veces dependiendo de la cepa de *V. cholerae*. El hecho de que existen varias copias de TTTTGAT sugiere que se necesita más de una molécula de la proteína para unirse productivamente al DNA (Fig 1) (10,39,55).

Se han identificado también sitios de unión para ToxR que se requieren para la activación de la transcripción en el promotor de *ompU*. Interesantemente, estas secuencias no parecen tener similitud con las que se encuentran en los promotores de *toxT* y *ctxAB* (Fig 1). El modelo para la activación del promotor de *ompU* propone que ToxR se une por lo menos a dos regiones y que la unión de ToxR a los sitios más lejanos promueve la unión de otros dímeros de ToxR a los sitios de unión río-abajo ("downstream"). El modelo propone que esto ocurre a través de interacciones proteína-proteína que puede involucrar la unión cooperativa de ToxR. Las interacciones cooperativas entre dímeros de ToxR pueden ser un componente importante de la expresión de los genes regulados por éste (17).

ToxS en la actividad de ToxR

Aún cuando en la mayoría de los estudios mencionados ToxR parece ser suficiente para activar la transcripción de los diferentes genes, el hecho de que la activación del promotor de *ctxAB* se aumenta si ToxR interactúa con otra proteína de membrana, ToxS, hace pensar que en todos los sistemas anteriores ToxS también participa como elemento adyuvante.

En torno a su localización en el cromosoma, el gen *toxS* se encuentra a la derecha del gen *toxR* y forma con este último un solo operón. ToxS no es indispensable para la expresión o acción reguladora de ToxR, pero se ha inferido que actúa modificando a ToxR de tal forma que favorece la activación de la transcripción de *ctxAB* (18,44,55). Es posible que el nivel de participación de ToxS en

la activación de *ctxAB* sea a través de favorecer la formación de dímeros de ToxR, que se ha propuesto como la forma activa de la proteína (17).

Participación de ToxT en el regulón ToxR

Como se mencionó antes, uno de los genes directamente activado por ToxR es *toxT*. Este gen es muy importante ya que su ausencia causa la expresión disminuida o prácticamente nula de varios factores de virulencia en *V. cholerae*. De hecho, la proteína ToxT puede activar de manera muy poderosa el promotor de *ctxAB* y activa también al promotor de *tcpA*. Dado que la expresión de *toxT* se activa por ToxR, ToxT es entonces una especie de regulador secundario que activa a algunos genes que dependen de ToxR. ToxT sería entonces parte de un sistema de cascada a través del cual ToxR lleva a cabo, de forma indirecta, la regulación de genes de virulencia en *V. cholerae* (14), además de su participación directa en la regulación de otros genes, como *ompU* y *ompT*.

La proteína ToxT (32 kDa) pertenece a la familia de activadores transcripcionales tipo AraC y en su extremo carboxilo tiene un motivo de hélice-vuelta-hélice característico de esta familia de activadores (14,59). Su extremo amino no muestra similitud significativa con otros miembros de esta familia, tal como sucede con otras proteínas de tipo AraC. Se ha propuesto que ToxT podría detectar algunas señales ambientales en las condiciones en que se expresa el regulón ToxR, y que el extremo amino de ToxT podría funcionar como sitio de interacción con un efector (23,58).

ToxT activa la transcripción de *ctxAB* y su efecto es quizá el más importante para la producción de CT. La influencia de la función de ToxT en la activación de *ctxAB* ha derivado principalmente de estudios *in vitro*, y a menudo usando *E. coli* como hospedero heterólogo. De acuerdo a estos experimentos se proponía que ambos, ToxR y ToxT, podían activar independientemente la transcripción de *ctxAB* (11,43). Esta propuesta contrastaba con la indicación de que *in vitro* *ctxAB* es activado sólo por ToxT en *V. cholerae* (6,15). Tal parece que los resultados *in vitro* concuerdan solo parcialmente, ya que en un modelo *in vivo* se vió que se aumenta el nivel de

ToxR activo como resultado de la colonización, el cual actúa en conjunto con ToxT para inducir la transcripción de *ctxAB* (38). Es decir, *in vivo* ambos ToxT y ToxR son capaces de activar a *ctxAB*, lo que sería totalmente consistente con el hecho de que existen sitios de unión tanto para ToxT como para ToxR en este promotor (11).

ToxT también controla la expresión de TCP y de los genes *acf* que codifican para un factor accesorio de colonización, ACF, que parece tener una función en transducción de señales asociadas con la motilidad (14,52,54). Similar a ToxR, los sitios de unión y activación en los promotores a los que ToxT se une son diferentes y no parecen poseer una secuencia consenso (52). Por la falta de homología a nivel de secuencia, igualmente se propone que ToxT reconoce la topología de las regiones promotoras que activa, ya que ellas también poseen abundantes A+T.

La transcripción dependiente de ToxT, al igual que la dependiente de ToxR, es afectada por algunas señales ambientales. Por ejemplo la bilis, que aumenta la motilidad de los vibrios y que se ha especulado es un factor de quimiotaxis, reduce la expresión de los genes activados por ToxT cuando se agrega al medio de cultivo. Curiosamente, en cultivos *in vitro* la bilis al 0.4% estimula la actividad de ToxR aumentando la transcripción del gen *toxT* (58). Al parecer, el crecimiento en presencia de bilis promueve la inactivación de ToxT, dando como resultado una reducción en la expresión de sus genes blanco. Al igual que sucede con otros miembros de la familia AraC, se ha predicho que la actividad de ToxT es afectada por la interacción directa de la proteína con una molécula pequeña, y que en este caso podría ser el ácido deoxicólico de la bilis. El efecto de la bilis y tal vez de otros factores ambientales sobre la actividad de ToxT, puede orquestar una respuesta mediante la cual la bacteria regula cautelosamente la expresión espacio-temporal de sus factores de virulencia durante su tránsito por el intestino (58).

En lo que se refiere al control de la transcripción, el gen *toxT* depende en primer lugar de un promotor cercano que es activado por ToxR. Dentro de este promotor existen secuencias que contienen un sitio específico de unión de ToxR, como se ha demostrado en experimentos de retardamiento en gel y "footprinting" (9,25). Muy recientemente se ha demostrado que además de ToxR, y/o ToxR/S, otro

par de proteínas reguladoras, *TcpP* y *TcpH*, tienen una función esencial en la activación del promotor de *toxT* (Fig 2) (5,22).

Análogamente a *ToxR/S*, *TcpP/H* son los productos de la transcripción de un mismo operón y son, además, proteínas de membrana interna. Cuando *TcpP/H* son expresadas de forma aumentada por un promotor ajeno, pueden activar la expresión del gen *toxT* en ausencia de *ToxR*. Sin embargo, se ha visto que cuando *ToxR/S* y *TcpP/H* actúan en conjunto ocurre la expresión óptima de este gen (5,22,36).

Por su parte, la síntesis de *TcpP/H* está controlada por otro par de proteínas denominadas *AphA* y *AphB*, que son activadoras del promotor de *tcpPH* (Fig 2) (34,35,61). Aparentemente, la actividad de estas proteínas depende de estímulos ambientales como pH y temperatura, pero estos estímulos no parecen afectar la expresión de sus respectivos genes (34,35). *AphA/B* y *ToxR/S* son los productos de genes pertenecientes al genoma ancestral de *V. cholerae* a diferencia de *TcpP/H* y *ToxT*, que son los productos de genes adquiridos por transferencia horizontal. Esto es, *tcpP/H* y *toxT* pertenecen al grupo de genes TCP, los cuales se encuentran en el genoma de un bacteriófago filamentoso, *VPI ϕ* , que codifica para una fimbria (pilus) de tipo IV (TCP). Además de su importante función en la colonización, el TCP sirve como receptor para el fago *CTX ϕ* (32,33).

Además del promotor cercano regulado por *ToxR*, el control de la expresión de *toxT* depende de un promotor distal que dirige la expresión de *tcpA*. Por encontrarse al inicio del operón, este promotor controla la expresión del grupo de genes TCP. Dado que este operón incluye al gen *toxT* y que *ToxT* induce la expresión de *tcpA*, la transcripción desde este promotor resulta en un mecanismo de autorregulación para *toxT* (Fig 2) (4,70). Esta propuesta se apoya en que cuando se muta el promotor de *tcpA* se causa reducción en los niveles de mensaje para *toxT* en una cepa clásica (70).

El modelo de regulación de la expresión de *toxT* es complejo, ya que involucra otros elementos que regulan la actividad del promotor de *tcpA*, como *VarA* (69), que actúa de forma positiva y la proteína represora por catabolitos dependiente

de AMPc (CRP), que tiene un efecto represor (Fig 2) (59).

VarA comparte similitud con la familia de activadores de dos componentes y es homóloga a GacA de *Pseudomonas*, que es un regulador de respuesta global de metabolismo secundario. GacS (LemA) funciona como la cinasa sensora asociada a GacA, y se ha visto que el sistema GacS/GacA ejerce un efecto positivo en la regulación genética dependiente de la densidad celular, en conjunto con los sistemas de regulación mediados por N-acil-homoserin lactonas, en 3 especies de *Pseudomonas* (7). No se sabe aún qué estimula a VarA en *V. cholerae* para que active al promotor de *tcpA*, ni se ha encontrado una cinasa asociada a esta proteína. Sin embargo, recientemente, se encontró que las proteínas Pta (fosfotransacetilasa) y PtfA (fosfotransferasa) influyen en la cascada de regulación de ToxR (8), por lo que se ha especulado que Pta podría fosforilar a VarA. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que exista un homólogo de GacS en *V. cholerae*.

Papel de H-NS en la regulación del regulón ToxR

Además de los reguladores arriba mencionados, recientemente se ha demostrado que H-NS juega un papel importante en la regulación de la expresión de factores de virulencia en *V. cholerae* (47).

H-NS se encuentra distribuída ampliamente entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y puede modular la expresión de genes de virulencia localizados en plásmidos o islas de patogenicidad. H-NS es una proteína pequeña muy abundante que promueve la condensación del DNA cromosomal, e influye sobre la expresión de muchos genes no relacionados. H-NS parece funcionar organizando las regiones promotoras y reguladoras en complejos nucleoproteicos que pueden cambiar en respuesta a la osmolaridad, temperatura, anaerobiosis, pH y fase de crecimiento del cultivo (1).

H-NS se une preferencialmente a regiones de DNA que adoptan curvatura y que son ricas en A+T, en el sitio consenso 5'-TNTNAN-3', donde N representa a cualquier nucleótido (1). Los promotores de *toxT*, *ctxAB* y *tcpA* poseen características

que serían compatibles con la unión de H-NS (Fig 3) (47).

En la mayoría de los casos, H-NS modula la expresión de genes de virulencia en forma negativa. Se propone que en los genes en que los sitios de unión de H-NS se sobrepone con los elementos del promotor, ésta disminuye la transcripción al evitar la unión de la RNA Polimerasa. También hay promotores en los que los sitios de unión de H-NS se encuentran fuera de la región promotora inmediata (caso de *toxT*) y se ha sugerido que H-NS puede reprimir la transcripción afectando la formación del complejo abierto en el promotor (1).

En *V. cholerae* H-NS tiene un efecto represor fuerte sobre el promotor de *toxT*. En este promotor H-NS parece unirse a la región que va desde la posición -172 y hasta la posición -256 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Fig 3). H-NS tiene también un efecto significativo y de carácter negativo sobre la expresión de *ctxAB*. La eliminación de *hns* da como resultado un nivel de expresión de *ctxAB* que es igual o mayor al nivel silvestre, aún en ausencia de ToxT. Interesantemente, en una mutante *hns* que además carece de ToxR y ToxT, la expresión de *ctxAB* es menor que en una mutante *hns* que tiene ToxR pero a la que le falta ToxT. Esto sugiere que en ausencia de H-NS, ToxR activa directamente al promotor de *ctxAB* (47).

Por lo anterior, una de las funciones de los reguladores en la cascada de regulación de ToxR, parece ser el contrarrestar la represión por H-NS, aunque en algunos casos, los activadores se necesitan aún en ausencia de H-NS para activar la expresión de sus genes blanco. Este parece ser el caso de la expresión de *tcpA*, ya que ToxT se requiere para su máxima expresión en una mutante *hns* (47).

Regulación específica entre los dos biotipos de *V. cholerae* O1

Todos los componentes del sistema de regulación antes descritos parecen estar presentes en los dos biotipos de *V. cholerae* O1, clásico y El Tor. En ambos biotipos se requiere al menos de ToxR, TcpP y ToxT para la producción de CT, TCP y los demás factores de virulencia que se encuentran dentro del regulón ToxR. Más aún, las secuencias involucradas en la regulación se encuentran presentes y están

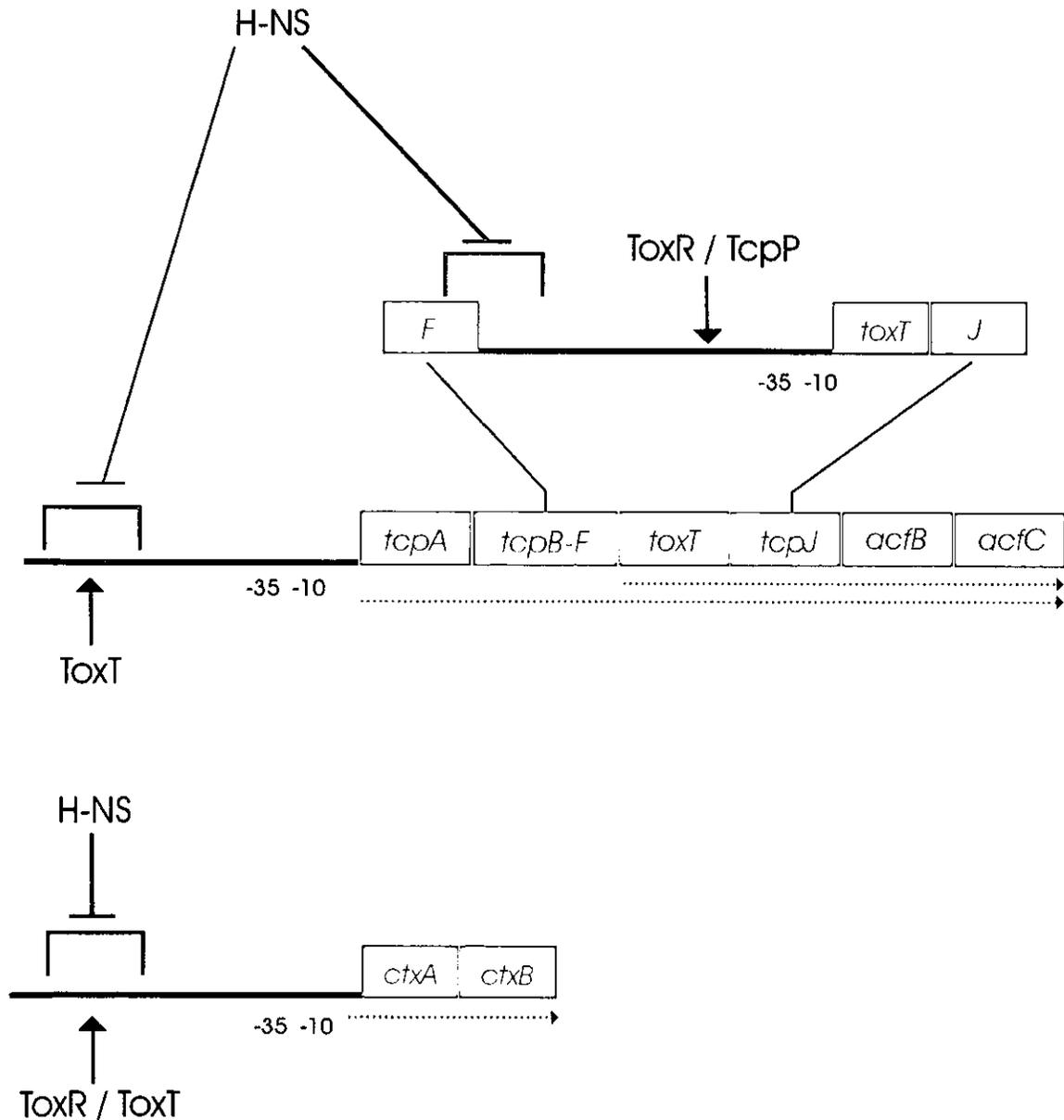


Figura 3. Modelo para la modulación negativa de la expresión de genes de virulencia ejercida por H-NS. (Arriba) H-NS afecta de forma negativa dos etapas dentro del operón *tcp*. El efecto principal ocurre en el promotor cercano de *toxT*. La región requerida para esta actividad se localiza en la posición -172 río-arriba con respecto al inicio de la transcripción de *toxT*. El efecto negativo de H-NS sobre el promotor de *toxT* es contrarrestado por ToxR/TcpP. H-NS también ejerce un efecto menor sobre el promotor del operón *tcp*, localizado río-arriba de *tcpA*. Este efecto es contrarrestado por ToxT. (Abajo) H-NS también ejerce un efecto negativo fuerte sobre el promotor de *ctxAB*. Este efecto es contrarrestado por ToxT, con la posible contribución adicional de ToxR. (Tomado de la ref. 47).

altamente conservadas en los dos biotipos. Sin embargo, existen diferencias muy interesantes, ya que el mecanismo que controla la expresión de *toxT* tiene un grado de especificidad asociada al biotipo (15,36,45). Es decir, las cepas clásicas producen CT y TCP en condiciones experimentales muy variables, mientras que las cepas El Tor requieren condiciones de crecimiento específicas. Un tipo de condición aparentemente óptima para la síntesis de CT y TCP por el biotipo El Tor es el denominado cultivo tipo AKI. En un cultivo tipo AKI parece ocurrir la expresión adecuada de los genes controlados por *ToxR* (15,26,30,40).

Las condiciones de cultivo AKI son diferentes a lo típico para cultivo de enterobacterias en el laboratorio. En un cultivo tipo AKI se debe iniciar con un inóculo muy pequeño (aprox. 1×10^8 bacterias) en un volumen de 10 ml de medio contenidos en un tubo u otro recipiente similar. El vibrio crece en el tubo por 4 horas a 37°C sin agitar, y transcurrido este tiempo, se debe transferir el cultivo a un matraz que permita un volumen de aire 10 veces mayor al volumen líquido. Entonces, el cultivo es sometido a agitación en el matraz, por un período de hasta 14 horas a 37°C (26).

Aún se desconoce por qué las cepas El Tor requieren de estas peculiares condiciones de cultivo, pero recientemente se encontró que la expresión de *toxT* a partir de un plásmido con el promotor inducible *P_{tac}* prácticamente eliminó en una cepa El Tor la necesidad del cultivo AKI para lograr la síntesis eficiente de CT (15). Esto nos indicó que en las cepas El Tor *ToxT* tiene un papel fundamental en la respuesta a las condiciones AKI y la síntesis de CT.

Para definir cómo es que *ToxR* y *ToxT* modulan la expresión de *toxT* y *ctxAB* en las cepas de *V. cholerae* El Tor, en este trabajo se decidió investigar la transcripción de *toxT* y *ctxAB* a lo largo de un cultivo en condiciones AKI.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la regulación de la expresión de factores de virulencia en *Vibrio cholerae* El Tor.

Objetivo particular

Determinar las bases moleculares del requerimiento de condiciones de cultivo especiales para el control de los genes de virulencia *ctxAB* (toxina de cólera) y *tcpA* (pili corregulado con la toxina de cólera) por los reguladores ToxR y ToxT en *Vibrio cholerae* El Tor.

Objetivos específicos

- a)** Determinar en qué etapa del cultivo en condiciones AKI se induce la expresión del gen *toxT* y del operón *ctxAB*.
- b)** Determinar si en condiciones de cultivo AKI la expresión de *toxT* está sujeta a la presencia y/o actividad del regulador ToxR.
- c)** Determinar si la expresión de *tcpA* se regula de forma paralela al control de *ctxAB* en condiciones no inductoras (no-AKI).
- d)** Determinar si la actividad del regulador ToxT es influenciada por la fase de agitación en los cultivos en condiciones AKI.

**MATERIALES
Y METODOS**

Cepas Bacterianas

En la mayoría de los experimentos realizados se utilizó la cepa de *V. cholerae* El Tor E7946. Se utilizaron células electrocompetentes comerciales de *E. coli* DH10B (Gibco-BRL) como cepa intermediaria para clonación, siendo la receptora final una cepa de *V. cholerae* El Tor. La cepa VJ739 (6) es una mutante de fenotipo ToxT⁻ de la cepa E7946 y sirvió como receptora de plásmidos. La cepa de *V. cholerae* clásico O395 se utilizó para generar los productos de "primer extension" (P.E.) que sirvieron como referencia para calcular los tamaños aproximados de los productos de P.E. para *toxT* y *ctxA* de la cepa El Tor.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia o fuente
cepas de <i>E. coli</i>		
DH10B	células electrocompetentes comerciales	Gibco-BRL
S17-1	derivada <i>recA</i> de <i>E. coli</i> 294 (F ⁻ <i>thi pro hsdR</i>) con genes de transferencia <i>IncP</i> de <i>pRP4</i> integrados al cromosoma, Sm ^r	56
cepas de <i>V. cholerae</i>		
O395	biotipo clásico	CCL ^a
E7946	biotipo El Tor, Sm ^r	CCL
VJ739	cepa mutante en el gen <i>toxT</i> (Δ HTH) derivada de la cepa E7946, Sm ^r	6
VJ739/pMT5	VJ739 transformada con el plásmido MT5	Este trabajo
VJ739/pToxT ET	VJ739 transformada con el plásmido ToxT ET	Este trabajo
S17-1/pToxT ET	S17-1 transformada con el plásmido ToxT ET	Este trabajo
Plásmidos		
pMMB66 (EH o HE)	vector de clonación de bajo número de copias que contiene al promotor inducible <i>P_{tac}</i> , Amp ^r	20
pMT5	plásmido derivado de pMMB66HE que contiene al gen <i>toxT</i> clásico, sin su promotor	15
pToxT ET	plásmido derivado de pMMB66EH que contiene al gen <i>toxT</i> El Tor, sin su promotor	Este trabajo

a. Colección de cepas del laboratorio.

Condiciones de crecimiento

Los cultivos para la cepa de *V. cholerae* O395 se hicieron a 30°C en medio Luria-Bertani (LB; Bacto Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) y agitación orbital. La cepa de *V. cholerae* E7946 se creció a 37°C en medio AKI (26) (Bacto Peptona 1.5%, Extracto de levadura 0.4% y NaCl 0.5%) sin bicarbonato de sodio (27), en condiciones estándar de crecimiento AKI (26) o en condiciones de crecimiento no-AKI (ver adelante). Se utilizaron los antibióticos: Ampicilina (Amp) y Polimixina B (Pol B) a una concentración de 100 µg/ml y 100U/ml, respectivamente, en caso de ser necesario.

Los cultivos de la cepa clásica se iniciaron a partir de un cultivo de 5 ml que estuvo en agitación toda la noche. De este cultivo se tomaron 0.5 ml y se diluyeron en 50 ml de medio LB nuevo para realizar un cultivo en agitación por 2 a 5 horas, a 30°C.

Los cultivos en condiciones estándar de crecimiento AKI se realizan inoculando 10 ml de medio AKI contenidos en un tubo de vidrio de 15 x 150 mm, o bien, un vial de vidrio de 20 x 60 mm, con 2 µl de una suspensión de bacterias en solución salina 0.9% (SS) o amortiguador salino de fosfatos (PBS), con una lectura de absorción a 600 nm (A_{600}) de 1.0. El tubo o vial es incubado por 4 horas en forma estática a 37°C y transcurrido este tiempo, el contenido se vierte a un matraz Erlenmeyer de 125 ml, donde será incubado por el resto del tiempo de cultivo en agitación orbital a 190-200 rpm y 37°C (26).

Debido a que los rendimientos bacterianos en las primeras etapas de cultivo son muy bajos, la cepa El Tor E7946 se cultivó en volúmenes grandes (a escala) (16) a fin de obtener masa bacteriana suficiente, principalmente de las primeras horas de cultivo y/o en cultivos con baja densidad de crecimiento. Los cultivos a escala fueron diseñados para ser equivalentes a los cultivos de 10 ml en tubos de 15 x 150 mm (26) y se llevaron a cabo con volúmenes de 500 ml, en probetas de 500 ml. El medio se inoculó con un volumen de 100 µl de una suspensión de bacterias en PBS, con una lectura de $A_{600}=1.0$. La probeta se incubó estáticamente a 37°C por 4

h, tiempo después del cual, el cultivo se vertió en un matraz Erlenmeyer de 2 litros (L) para continuar con el crecimiento bajo agitación orbital (200 rpm) por 6 horas adicionales (condiciones AKI).

Se definieron como condiciones de cultivo no-AKI aquellas en las que los cultivos se mantuvieron ya sea sin agitación (cultivo estático prolongado) o agitados sin un período estático previo (cultivo en agitación continua). Para la condición de crecimiento estático prolongado el cultivo se mantuvo en la probeta durante el tiempo de cultivo y para el crecimiento en agitación continua, el cultivo de 500 ml se agitó orbitalmente desde el inicio en un matraz de 2 L.

Aislamiento de RNA y ensayos de "Primer Extension" (P.E.)

Para aislar RNA total se cosecharon bacterias de alícuotas de 25 a 50 ml de cultivo cada hora, que se enfriaron rápidamente colocándolas sobre hielo para luego recuperar las células por centrifugación. Generalmente, las pastillas bacterianas se almacenaron inmediatamente a -20°C , para llevar a cabo la extracción de RNA al día siguiente. El RNA se obtuvo a partir de las pastillas bacterianas usando el reactivo TRIzol (Gibco-BRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras de RNA fueron sometidas a tratamiento con DNasa I para eliminar el DNA remanente. Al final del procedimiento, las concentraciones de RNA se ajustaron a $5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en base a su absorción a 260 nm (A_{260}). Esto sirvió para compensar las deficiencias en densidad bacteriana a los distintos tiempos de la curva de crecimiento, así como las diferencias entre los cultivos. Además, las alícuotas de RNA total se corrieron en geles de agarosa para estimar visualmente las concentraciones en las muestras, que fueron siempre consistentes con los valores de A_{260} .

Los experimentos de P.E. para los transcritos de *toxT* y *ctxA* se realizaron de forma descrita anteriormente (24), usando como iniciador ("primer") para *toxT* el oligonucleótido 5'-CATTAGTTTGAAAAGATTTTTTCCCAATCAT-3', donde el triplete subrayado es complementario al codón ATG para el primer aminoácido de ToxT. El

oligonucleótido específico utilizado para la extensión de *ctxA* fue 5'-GAATCTGCCGATATAACTTATCATCATTGCAT-3', donde los nucleótidos subrayados son complementarios al codón del aminoácido número 8 en la secuencia de la proteína CtxA madura.

Los iniciadores se marcaron en el extremo 5' con [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP utilizando polinucleótido cinasa del fago T4, se purificaron y concentraron en columnas QuickSpin Columns Sephadex G-25 (Boehringer-Manheim), y se acoplaron con 5 μg de cada muestra de RNA. La reacción de alineamiento se realizó calentando las muestras a 95°C por 1 min., seguida por 2 min. a 55°C y enfriando inmediatamente en hielo por 15 minutos. Los transcritos fueron extendidos con 20 U de transcriptasa reversa Superscript II, libre de Rnasa H (Gibco-BRL), por 45 min. a 44°C, en 1X del amortiguador para la reacción de transcripción reversa (First strand buffer), 1mM de ditioneitol (DTT) y 0.25 mM de mezcla de deoxinucleótidos, por μl de mezcla de reacción. Los productos de extensión se separaron por electroforesis en geles para secuenciación (poliacrilamida al 8%, urea 7M y amortiguador tris-boratos, TBE), cargando en cada pozo 5 μl de la mezcla de reacción en todos los experimentos. Los productos de P.E. se detectaron por autorradiografía.

RT-PCR de transcrito para *toxT*

Se obtuvo evidencia para la presencia de mensaje de *toxT* tratando alícuotas de las muestras de RNA con transcriptasa reversa (RT) de virus de leucemia murina (MuLV), seguida por reacción de PCR con DNA polimerasa AmpliTaq, usando un estuche ("kit") de reactivos GenAmp RNA-PCR (Perkin-Elmer) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (reacción de RT-PCR: reverse transcription-polimerase chain reaction, por sus siglas en inglés). Así mismo, se hicieron reacciones de RT-PCR usando RT Superscript II, libre de Rnasa H (Gibco-BRL), seguida por reacción de PCR con DNA polimerasa Taq (Gibco-BRL) teniendo igualmente muy buenos resultados. Como medida de control para corroborar la ausencia de DNA templado contaminante en las muestras de RNA, se corrieron reacciones de PCR para cada

una de las muestras examinadas, usando los mismos componentes del estuche de reactivos pero omitiendo la RT. La falta de productos de amplificación en las muestras sin RT confirmó que los productos de PCR obtenidos provenían de cDNAs.

El oligonucleótido "upstream" (río-arriba) utilizado para la reacción de RT-PCR de RNAm para *toxT* fue 5'- CTTTACGTGGATCCCTCTCTGCG-3', donde la G subrayada es complementaria a la posición -31 con respecto al codón de inicio ATG. El oligonucleótido "downstream" (río-abajo) utilizado fue 5'- CTACCCAAGTGCAGTGATACAATC-3', donde el triplete subrayado es la secuencia complementaria al codón de paro de *toxT* (TAG) (Fig. 4). Para la reacción de RT-PCR control de *ctxA* el oligonucleótido "upstream" utilizado fue 5'- CGTTTGGATCCAGGGAGCATTATATGGTAAAG-3', donde el triplete subrayado corresponde al codón de inicio y el oligo "downstream" fue 5'- GCGATAAGCTTCATAATTCATCCTGAATC-3', donde los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia complementaria del codón de paro de *ctxA*.

También, se realizaron reacciones de RT-PCR para detectar un fragmento de DNA que incluye al gen *tcpF*, que se localiza inmediatamente antes del gen *toxT*. Se obtuvieron muestras de RNA a las horas 4, 6, 8 y 10, de un cultivo crecido en condiciones AKI. Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron los oligonucleótidos: 5'-CTTTTCGCTCGTCGACAACTAAG-3' ("upstream"), donde la G subrayada corresponde a la posición -23 con respecto a la A del codón para el primer aminoácido de la proteína TcpF, y 5'-CATTAGTTTGAAAAGATTTTTTCCCAATCAT-3' ("downstream"), que es el mismo oligonucleótido que se utilizó para la reacción de P.E. de *toxT*. El tamaño hipotético para el producto de amplificación corresponde aproximadamente a 1.3 kb (1,272 pb).

Inmunodetección de ToxR

La detección de la proteína ToxR se hizo a partir de pastillas bacterianas recolectadas en los mismos tiempos a los que se tomaron las alícuotas para RNA durante el cultivo AKI. Debido a las bajas concentraciones bacterianas en las primeras

Secuencia de oligos para la amplificación del gen *toxT*

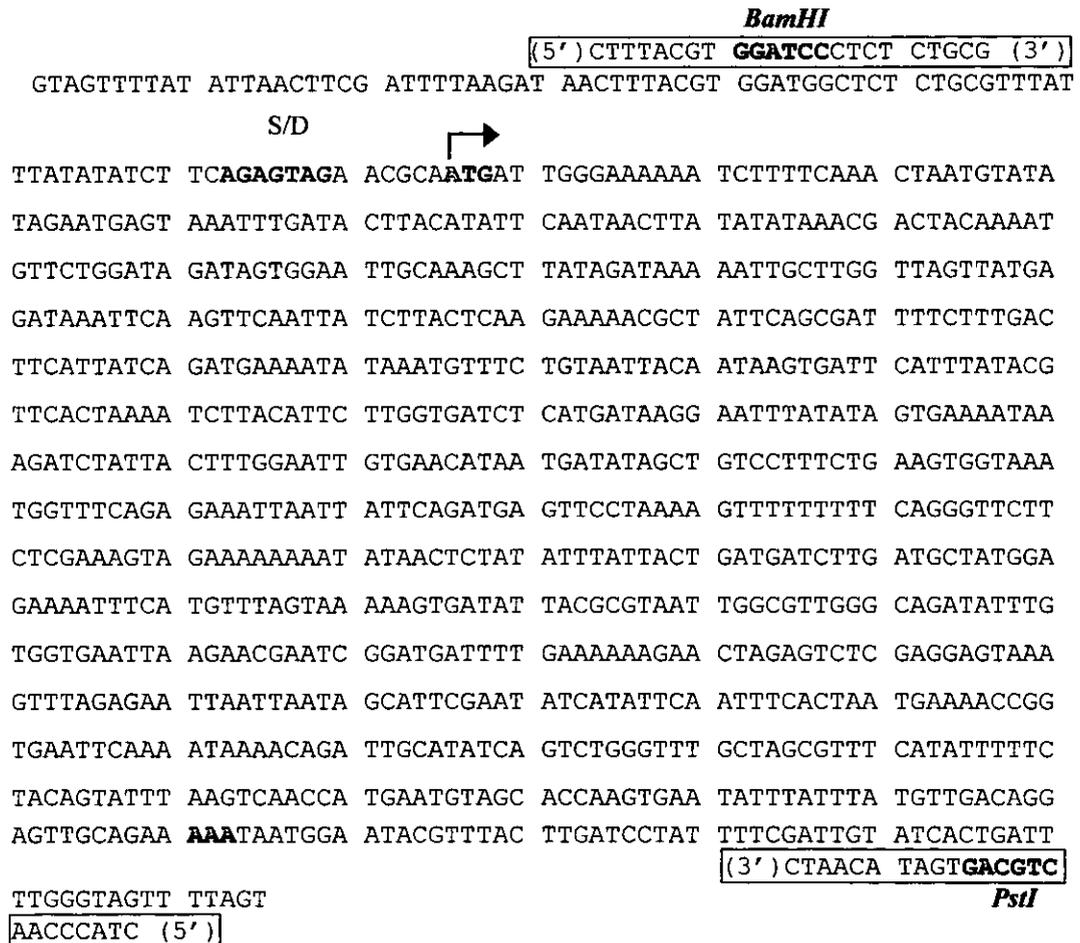


Figura 4. En esta figura se muestra la secuencia del gen *toxT* de *V. cholerae* y de los oligonucleótidos utilizados para su amplificación por PCR. Los oligonucleótidos se diseñaron de manera tal que introducen los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I para clonación del gen en el plásmido pMMB66EH (20).

horas, la cantidad de muestra requerida para mediciones de proteínas e inmunoblots involucró el procesamiento de volúmenes relativamente grandes de cultivo. A pesar de ello, el procesamiento de volúmenes de cultivo con baja densidad bacteriana resultaba en material insuficiente, ya que la centrifugación de dichas muestras daba pastillas bacterianas muy pequeñas.

Para poder utilizar alícuotas de las muestras colectadas y no de cultivos paralelos, lo cual podría introducir variaciones, se optó por normalizar las concentraciones de las alícuotas determinando las concentraciones bacterianas a través de lecturas de absorción a 600 nm (A_{600}) antes de cosechar el cultivo. Los volúmenes de las pastillas bacterianas se ajustaron de acuerdo a los valores iniciales de A_{600} , y las alícuotas fueron resuspendidas directamente en amortiguador muestra ("sample buffer") para electroforesis. Los contenidos celulares se liberaron por ebullición y las muestras se colocaron en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio para ser separadas por electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se pasaron a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia, y las bandas inmunorreactivas se revelaron con técnicas estándar, usando antisuero de conejo contra ToxR (amablemente donado por J.J. Mekalanos), inmunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de conejo, conjugada con peroxidasa (Miles Laboratories), y α -cloronaftol como sustrato. Se utilizó un marcador comercial de peso molecular (High Molecular Range Rainbow Marker, Amersham) para confirmar la posición esperada para la banda inmunorreactiva de ToxR.

Inmunodetección de TcpA

Para la detección de TcpA se obtuvieron pastillas bacterianas de alícuotas de 50 ml de cultivo para las horas 3 y 4, y de 1.5 ml de cultivo para las horas subsiguientes, las cuales se resuspendieron en 100 μ l de PBS. Las células resuspendidas se lisaron por congelación-descongelación repetitiva y los contenidos proteicos totales se ajustaron al mismo valor, de acuerdo a determinaciones de proteína utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad). Se colocaron 5 μ l de cada muestra directamente sobre una membrana de nitrocelulosa ("dot blot") y se evaluó la presencia de TcpA por reacción *in situ* con anticuerpo monoclonal (MAb) anti-

TcpA 20:2 (29), IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa, y α -cloronaftol como sustrato. Los intentos para detectar TcpA con MAb 20:2 por medio de Western Blot no resultaron, probablemente debido a la baja reactividad del TCP de El Tor en este experimento (29), aún cuando si era útil para detección por "dot-blot" (41).

Después de la obtención de un MAb mucho más reactivo con la proteína TcpA de El Tor, MAb TcpET 2:13 (amablemente donado por S. Attridge), se realizó Western Blot de alícuotas tomadas a las horas 3, 4, 7 y 10, de un cultivo en crecimiento estático prolongado. Las muestras se normalizaron como se mencionó anteriormente y se separaron las proteínas por SDS-PAGE. Se pasaron a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia y las bandas proteicas inmunorreactivas se revelaron usando técnicas estándar con los anticuerpos MAb TcpET 2:13, anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa y α -cloronaftol como sustrato.

Detección de CT

V. cholerae secreta la CT al sobrenadante bacteriano muy eficientemente y la fracción de la toxina que permanece dentro de la célula es muy baja. Sin embargo, para determinar si bajo las condiciones experimentales usadas no había retención de CT en las células, se realizó su detección tanto en sobrenadantes de cultivo como en pastillas bacterianas. Las pastillas de 1 ml de cultivo se resuspendieron en 500 μ l de PBS, y los contenidos celulares se liberaron dando tres choques de ultrasonido en hielo. Los sobrenadantes y sonicados se evaluaron por ensayo de inmunosorbencia ligado a enzimas (ELISA) (62). Las placas de ELISA se forraron con gangliósido GM1 (Sigma) durante toda la noche a 4°C y se bloquearon con una solución de PBS/Albúmina Bovina (Sigma) al 0.2% por 30 min. a 37°C. Se hicieron diluciones dobles seriadas de las muestras, iniciando con un volumen de 200 μ l de muestra de los cuales se transfirieron 100 μ l al pozo siguiente que ya contenía 100 μ l de PBS y repitiendo lo mismo hasta llegar al último pozo. Se utilizó ya sea CT (Sigma) o la subunidad B de la CT (RCTB) (57) a una concentración de 1 μ g/ml, como estándar. La placa se incubó por una hora a temperatura ambiente (T°A). Enseguida, se colocaron 100 μ l/pozo de una solución 1:400 del MAb LT-39 (63)

reactivo con la subunidad B de la toxina y la placa se incubó por una hora a T°A. Finalmente, se colocaron 100 µl/pozo de una solución 1:1000 de IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa, se incubó la placa por una hora a T°A y se reveló con una solución de 10 mg de orto-fenilén-diamina (OPD) y 8 µl de H₂O₂, en 10 ml de amortiguador de citratos 0.1M con pH 4.5.

Clonación del gen *toxT* en el plásmido pMMB66EH

El gen *toxT* se amplificó a partir de DNA cromosomal de *V. cholerae* El Tor E7946 (ver Fig. 4). El producto de PCR se restringió con las enzimas *Bam*HI (Gibco-BRL) y *Pst*I (Gibco-BRL), lo mismo que el plásmido pMMB66EH (20), por una hora a 37°C. Después de este tiempo, se juntaron las restricciones tanto del vector como del producto de PCR y se ligaron utilizando ligasa del fago T4 (Gibco-BRL). El producto de ligación se electroporó a células DH10B y se probaron las colonias con resistencia a Amp. Al plásmido obtenido se le llamó pToxT ET, el cual, se introdujo posteriormente a células electrocompetentes de *V. cholerae* VJ739 preparadas en el laboratorio. Debido a las dificultades para obtener células viables de VJ739 después de la electroporación, se optó por transformar inicialmente células electrocompetentes de *E. coli* S17-1 (56) con dicho plásmido, seguido de conjugación con células de *V. cholerae* VJ739. Para la conjugación, se hicieron cultivos de 10 ml de cada una de las cepas: VJ739 y S17-1/pToxT ET en medio LB y LB Amp respectivamente, en crecimiento estático durante toda la noche a 37°C. A 9 ml de medio LB nuevo, se agregaron 900 µl del cultivo de VJ739 y 100 µl de cultivo de S17-1/pToxT ET y se dejó nuevamente en crecimiento estático durante toda la noche a 37°C. Una de las cualidades distintivas de las cepas de *V. cholerae* El Tor es que son resistentes al antibiótico Polimixina B (Pol B) a una concentración de hasta 100 U/ml, por lo que para diferenciar entre las colonias de *E. coli* y *V. cholerae* que contienen al plásmido pToxT ET, se seleccionaron las colonias con resistencia a ambos antibióticos, Amp y Pol B.

Cultivos con variaciones en las condiciones de crecimiento AKI

Se probó el efecto de algunas variaciones en las condiciones estándar de crecimiento AKI sobre la producción de CT. En un caso, se alargó la fase de crecimiento estático de 4 a 7 horas, seguida de 5 horas en fase de agitación. Se hizo un cultivo de la cepa E7946 en 10 ml de medio AKI contenidos en un vial de 6 cm de altura x 2 cm de diámetro (volumen máximo: 15 ml), inoculando 2 μ l de una suspensión de células en SS con una lectura de $A_{600} = 1.0$, que se mantuvo 7 horas en crecimiento estático (7hE) a 37°C. Después de este tiempo, el cultivo fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y agitado orbitalmente a 190 rpm, por 5 horas más (5hA) a 37°C. Se hizo un cultivo en condiciones estándar de crecimiento AKI, como control. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivo las cuales se centrifugaron para separar sobrenadante y pastilla bacteriana, a las horas 9 (7hE + 2hA) y 12 (7hE + 5hA) y del cultivo control, a las horas 6 (4hE + 2hA), 9 (4hE + 5hA) y 12 (4hE + 8hA), a partir del inicio del cultivo.

También, se hicieron cultivos de 10 ml de la cepa E7946 en los que se incubó en fase de crecimiento estático por 4 horas a 37°C en medio AKI, y transcurrido ese tiempo, los cultivos se centrifugaron. Las pastillas bacterianas obtenidas se resuspendieron en igual volumen de medio AKI nuevo o medio LB y se agitaron orbitalmente a 190 rpm y 37°C por 2 horas. Al finalizar los cultivos, se ensayó la producción de CT en los sobrenadantes de cultivo por medio de GM1-ELISA.

Cultivos con las cepas VJ739 (pMT5) y VJ739 (pToxT ET)

Primeramente, se obtuvo la cepa VJ739 (pMT5) electroporando el plásmido pMT5 en células electrocompetentes de *V. cholerae* El Tor VJ739 preparadas en el laboratorio (ver Tabla 2). Se hicieron cultivos de esta cepa en medio AKI con y sin inducción por IPTG. Ante la observación de producción de CT por esta cepa aún en ausencia del inductor, se procedió a clonar el gen *toxT* de la cepa El Tor en el mismo vector para evaluar si sucedía lo mismo. El plásmido obtenido, pToxT ET, se conjugó a la cepa VJ739 obteniendo la cepa VJ739 (pToxT ET) (ver Clonación del gen *toxT*- Materiales y Métodos).

Ambas cepas derivadas de VJ739, que contienen los plásmidos que codifican para *toxT* activo de *V. cholerae* clásico (pMT5) y El Tor (pToxT ET), se crecieron en medio AKI, en presencia o ausencia del inductor, por 8 horas a 37°C, en condiciones de cultivo no-AKI, y se evaluó la producción de CT en los sobrenadantes de cultivo por GM1-ELISA.

RESULTADOS

Crecimiento de *V. cholerae* El Tor bajo condiciones AKI y no-AKI

La Figura 5 presenta las curvas de crecimiento para la cepa E7946 en condiciones estándar de crecimiento AKI, crecimiento estático prolongado y crecimiento en agitación continua. El cultivo crecido en condiciones AKI, al igual que el cultivo crecido en agitación continua, tuvo una buena velocidad de crecimiento, dependiente del inicio de la fase de agitación. El cultivo en crecimiento estático prolongado alcanzó una lectura de $A_{600}=0.148$ a la hora 4 y de $A_{600}=0.22$ a la hora 5. De esa hora en adelante, los incrementos en la absorción a 600 nm fueron leves, indicando que se había alcanzado la fase estacionaria temprana. Se escogió la hora 10 para concluir este experimento con base en esta observación y para evitar la incubación excesiva de este cultivo. De acuerdo a experimentos previos, este tiempo corresponde a la fase estacionaria temprana para los cultivos en las otras dos condiciones de crecimiento. El período de incubación de 10 horas resultó también adecuado fisiológicamente en términos de la producción de CT, ya que las concentraciones de toxina a este tiempo y después del crecimiento toda la noche fueron muy similares.

Expresión de *toxT* y *ctxAB* en *V. cholerae* El Tor

Las muestras de RNA preparadas a partir de alícuotas de cultivo tomadas cada hora fueron sujetas a P.E. usando oligos específicos para *toxT* y *ctxA*. La Figura 6 muestra los productos de P.E. dependientes de ToxR y los niveles de CT para las horas 2 a la 8 y la hora 10. El producto de P.E. de *toxT* fue abundante a las horas 4 y 5, pero dejó de ser detectable después de este tiempo. Se observó la inducción de la transcripción de *ctxAB* tan pronto como el cultivo entró en la fase de agitación (Fig 6). Así mismo, el cambio a agitación condujo a la producción de CT y a su liberación en el sobrenadante del cultivo (Fig 6). Las concentraciones de CT aumentaron en paralelo con la intensidad del producto de P.E. de *ctxAB*. En contraste, y de acuerdo con experimentos que definieron las condiciones AKI (26), el crecimiento en agitación continua dió como resultado niveles de CT prácticamente no detectables, lo cual se reflejó en niveles no detectables de los productos de P.E. tanto para *toxT* como para *ctxAB*.

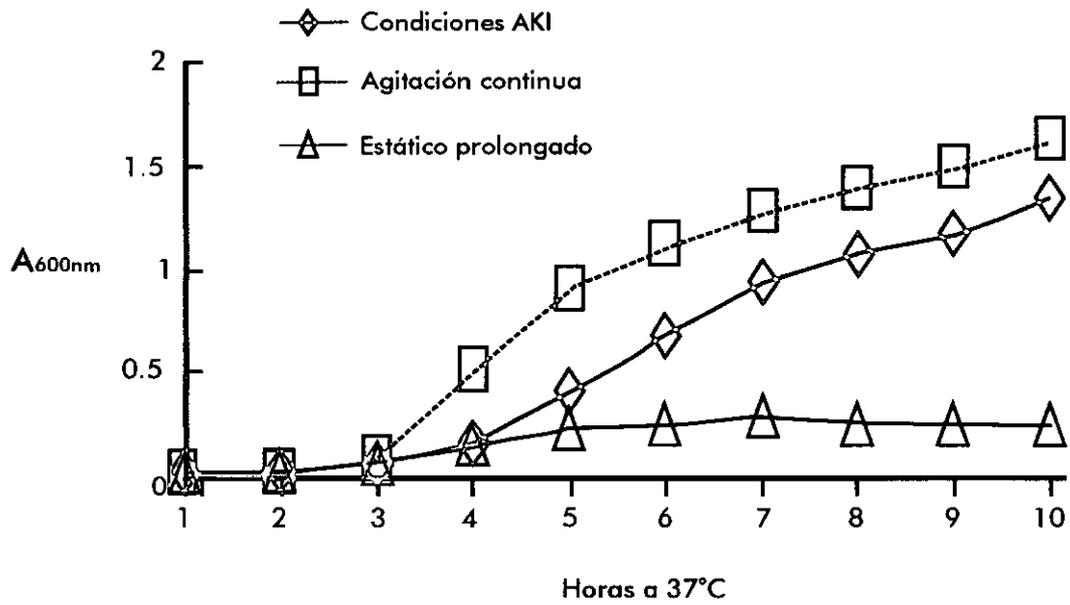


Figura 5. Curvas de crecimiento de *V. cholerae* E7946 bajo condiciones AKI y no-AKI. Los cultivos se crecieron por 10 horas en medio AKI a 37°C, bajo las condiciones de crecimiento: estático prolongado, agitación continua, o por el método AKI (Condiciones AKI).

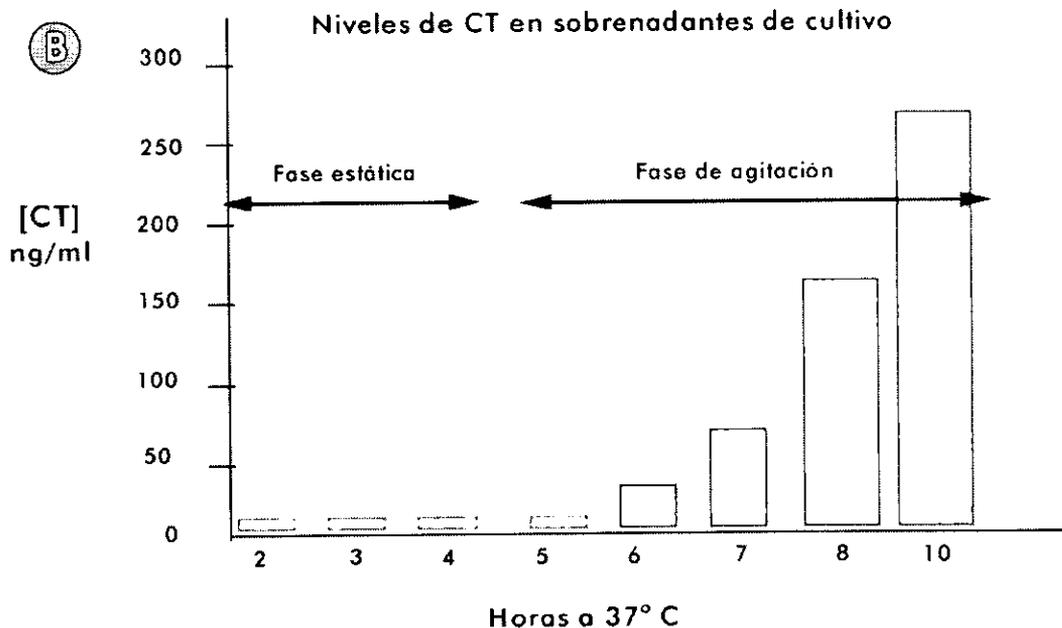
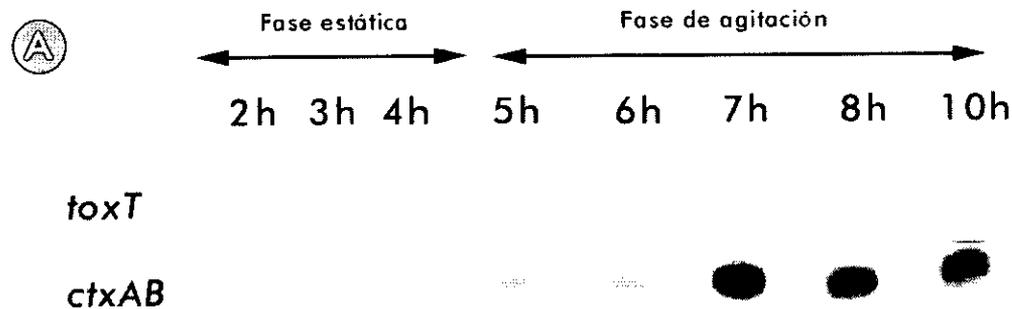


Figura 6. Expresión de *toxT* y *ctxAB* y producción de CT de *V. cholerae* E7946 crecida en condiciones AKI. (A) Los productos de P.E. se obtuvieron a partir de muestras de RNA total extraídas de bacterias colectadas cada hora. Los periodos de incubación en fase estática o de agitación se indican con las flechas dobles en la parte superior del panel. La figura se construyó con las secciones relevantes de las autorradiografías, para facilitar las comparaciones. A la izquierda se indica el producto de P.E. del que se trata. (B) Valores de CT determinados por GM1-ELISA. Las concentraciones mostradas se expresan como equivalentes de estándar de CT por unidad de volumen de sobrenadante de cultivo. Los niveles de CT en las pastillas bacterianas fueron menores a 3 ng/ml en todos los casos.

Los resultados para la transcripción durante el crecimiento estático prolongado fueron similares a aquellos para las condiciones AKI, con el producto de P.E. de *toxT* apareciendo a la hora 4 y desapareciendo después de la hora 5, a excepción de que la banda de P.E. para esta hora es de menor intensidad que la anterior (Fig 7). El producto de P.E. para *ctxAB* estuvo prácticamente ausente en crecimiento estático prolongado, excepto por la aparición de una banda muy débil a las 4 horas (Fig 7). Esta banda fue visible también en el cultivo AKI (Fig 6), sugiriendo una actividad basal baja de ToxT sobre la transcripción de *ctxAB* antes del inicio de la fase de agitación del cultivo.

Detección de la proteína ToxR

Para evaluar los niveles de ToxR durante el crecimiento AKI, se obtuvieron muestras de proteínas totales a lo largo de la curva de crecimiento y fueron analizadas por inmunodetección con antisuero anti-ToxR (Fig 8). Como se observa, la presencia de ToxR en las células se detectó desde la hora 2 y hasta la hora 10. Este experimento demuestra que ToxR está presente durante las fases de crecimiento estático y en agitación. Es de gran relevancia que ToxR esté presente durante la fase de agitación, ya que en el intervalo de las horas 6 a 10, no se detectó el producto de P.E. de *toxT* dependiente de ToxR (Fig 6). Esto sugiere que la transcripción transitoria de *toxT* no se debe a un efecto de las condiciones AKI sobre la expresión del gen *toxR*, sino que más bien depende, probablemente, del estado funcional de ToxR o de la participación de otros elementos reguladores positivos o negativos, en momentos específicos del cultivo.

RT-PCR para *toxT* como indicador de la presencia de un RNAm largo

Los experimentos con cepas clásicas de *V. cholerae* sugieren que después de la transcripción transitoria de *toxT* dependiente de ToxR, los transcritos de *toxT* se mantienen en la célula, como resultado de la transcripción dependiente de ToxT de un RNAm policistrónico largo que inicia en el promotor de *tcpA* (ver Fig 2) (70). Un modelo similar podría apoyar la transcripción sostenida de *ctxAB* que se observó

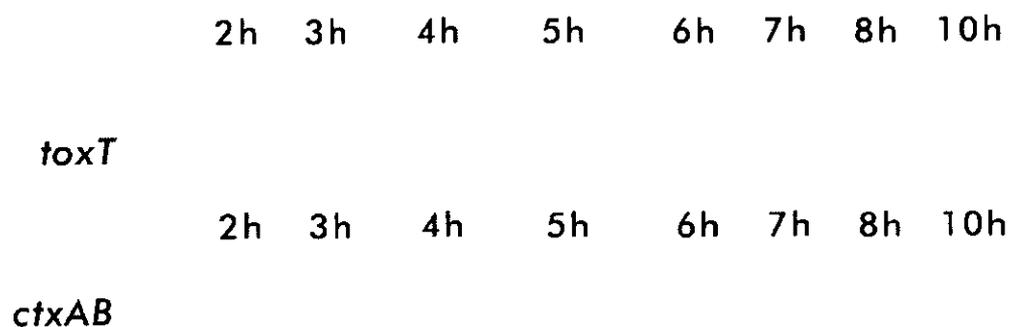


Figura 7. Expresión de *toxT* y *ctxAB* de *V. cholerae* E7946 en crecimiento estático prolongado. Los productos de P.E. se detectaron a partir de RNA obtenido de bacterias de un cultivo en crecimiento estático prolongado. Se usaron las secciones relevantes de las autorradiografías para elaborar la figura y facilitar las comparaciones. Las muestras de RNA obtenidas en los tiempos que se indican en la parte superior de cada panel, fueron sujetas a P.E. para *toxT* (panel superior) y *ctxAB* (panel inferior). Se puede observar una banda muy débil para *ctxAB* a la hora 4.

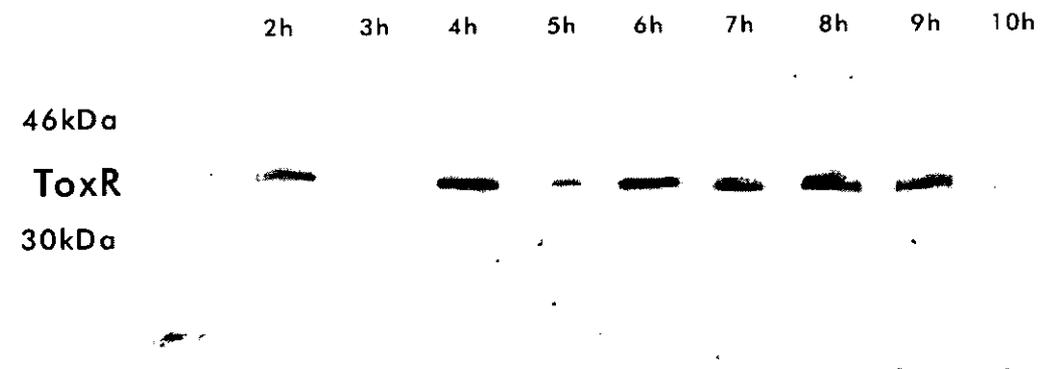


Figura 8. Inmunodetección de ToxR en *V. cholerae* E7946 crecido en condiciones AKI. Se obtuvieron pastillas bacterianas a lo largo de la curva de crecimiento tipo AKI y los tiempos a los cuales se tomaron las alícuotas del cultivo se muestran en la parte superior de la figura. Las diferencias en concentración de proteína se compensaron lisando las bacterias en volúmenes variables de amortiguador de SDS para muestra. ToxR fue detectado con un anticuerpo policlonal contra ToxR (J. Mekalanos). Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda, así como la posición de la banda inmunorreactiva para ToxR.

en la ausencia de la expresión de *toxT* dependiente de ToxR durante la agitación.

Para determinar si esto puede suceder, se tomaron alícuotas de RNA de las horas 6 a 10 de un cultivo tipo AKI y se sometieron a RT-PCR. La Figura 9 muestra los productos de RT-PCR obtenidos para *toxT*, cuyos tamaños son compatibles con la unión de los oligos a ambos extremos del gen estructural *toxT* (ver Fig 4). Este experimento demuestra la presencia de un RNAm para *toxT* en horas a las que no se detecta un RNAm nuevo resultado de la activación por ToxR. Las reacciones de control en las que se omitió la adición de RT no dieron productos de amplificación, confirmando la ausencia de DNA contaminante en las muestras (Fig 9). Se obtuvo confirmación adicional de detección de RNAm realizando reacciones de RT-PCR simultáneas con oligos para amplificar el gen *ctxA*, en muestras de RNA de los mismos tiempos de cultivo (datos no mostrados).

Para una mayor confirmación de la presencia de un transcrito largo que es producido desde el promotor de *tcpA* y que incluye al gen *toxT*, se realizó RT-PCR a muestras de RNA obtenidas en las horas 4, 6, 8 y 10, de un cultivo crecido en condiciones AKI. Los oligos utilizados para la reacción de PCR dan un producto de amplificación de aproximadamente 1.3 kb, que representa al gen *tcpF* completo, la región intergénica entre *tcpF* y *toxT*, y el codón de inicio de traducción de *toxT*. Se obtuvieron productos de RT-PCR para los fragmentos de *tcpF* a *toxT* en las muestras de las horas 4, 6 y 8, pero no se observó la presencia de un producto de amplificación a la hora 10 (datos no mostrados). Esto no se debió a la ausencia de RNA templado, ya que ésta fue confirmada por medio de visualización en un gel de agarosa al 1% previo a la reacción de RT-PCR.

Inmunodetección de TcpA

El promotor de *tcpA* se requiere para la expresión óptima de *toxT* y la producción de niveles altos de CT en *V. cholerae* clásico. Esto se debe a que la transcripción iniciada en este promotor da como resultado un mensaje policistrónico que incluye al gen *toxT* en su extremo 3' (3,70). Como una medida de la inducción

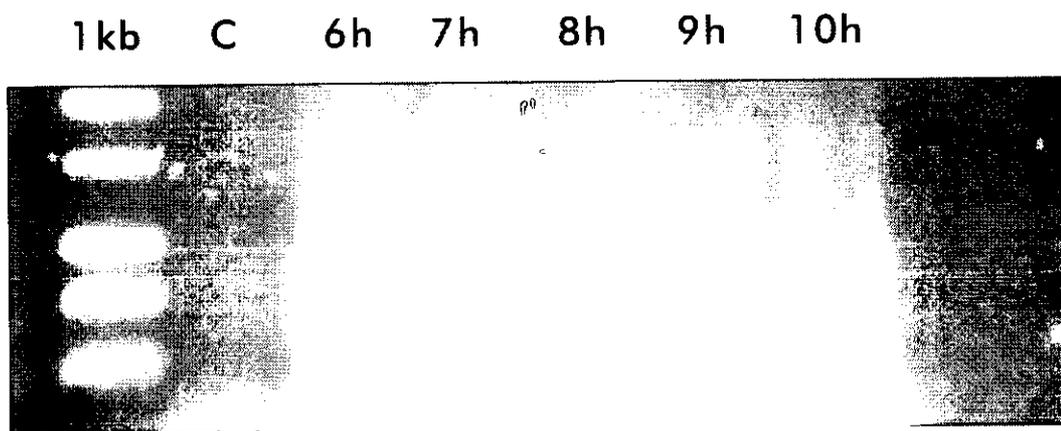


Figura 9. Detección por RT-PCR de un transcrito para *toxT*. Las muestras de RNA se obtuvieron a partir de alícuotas tomadas a las horas 6 a 10 de un cultivo crecido en condiciones AKI. Aquí se presenta un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1 kb, marcador de peso molecular (Promega); C, control negativo de RT-PCR para una muestra de RNA (hora 5) en ausencia de RT; 6h-10h, productos de RT-PCR para muestras de RNA de las horas 6 a 10 del cultivo tipo AKI (fase de agitación). Los productos de amplificación son compatibles con la unión de los oligos a ambos extremos del gen *toxT* (Fig 4). Es de notarse que, a excepción del RNA control, todas las muestras corresponden a horas en las cuales no se detectó transcripción de *toxT* dependiente de ToxR (ver Fig 6).

de *tcpA* en los cultivos de El Tor crecidos en condiciones AKI, se siguió la expresión de la proteína TcpA por "dot blot" utilizando un Mab específico (29). Esta sería una medida indirecta de la transcripción de *toxT* desde el promotor de *tcpA*, que únicamente sucede después de la activación transitoria de *toxT* por ToxR (41). Se obtuvieron alícuotas cada hora, desde la hora 3 hasta la 10, y se determinaron los niveles de TcpA por inmunodetección. Los resultados muestran que TcpA está presente en todos los tiempos muestreados, aunque el inicio de la fase de agitación del cultivo estimuló fuertemente la producción de TcpA (Fig 10, 5h). Después de este punto los niveles de TcpA permanecieron esencialmente constantes (Fig 10, 5-10h). Debido a que la síntesis de TcpA es fuertemente inducida por la presencia de ToxT en la célula (4), la expresión continua de TcpA durante la agitación apoya la idea de la expresión sostenida de *toxT* a partir del promotor de *tcpA*, ya que se dejó de detectar la transcripción de *toxT* dependiente de ToxR a partir de la hora 6 del cultivo (Fig 6).

El Western Blot de las muestras de proteína obtenidas a partir de alícuotas de cultivo en crecimiento estático prolongado a las horas 3, 4, 7 y 10, reveló que el promotor de *tcpA* tiene una actividad basal considerable a partir de la aparición del transcrito para *toxT* (Fig 11). Como se vió anteriormente, a la hora 4 aparece el transcrito de *toxT* dependiente de ToxR, y es entonces que se empieza a detectar una banda proteica inmunorreactiva que corresponde a TcpA. Las bandas inmunorreactivas de las horas 7 y 10 son de intensidad muy similar a la banda de la hora 4, lo que indica que el crecimiento estático prolongado no proporciona el estímulo que induce la producción de TcpA, como sucede con las condiciones AKI.

Producción de CT en cultivos con variaciones en las condiciones de crecimiento AKI

La Tabla 3 muestra la producción de CT en los sobrenadantes de los cultivos en los que se alargó la fase de crecimiento estático a 7 horas, y en los que se agitó sólo por dos horas después de 4 horas de crecimiento estático, sustituyendo por igual volumen de medio de cultivo nuevo en la fase de agitación.

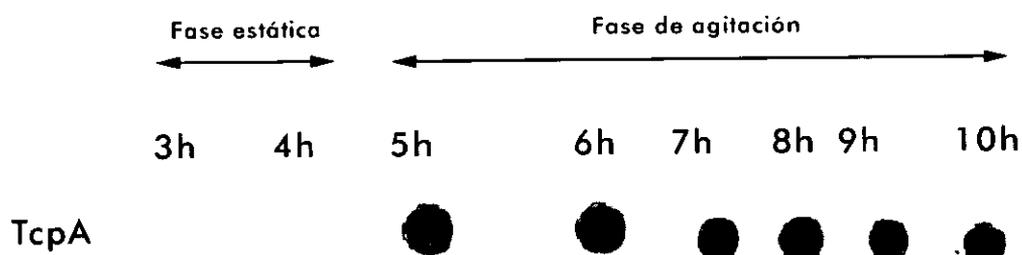


Figura 10. Inmunodetección de TcpA por "dot-blot". Se obtuvieron pastillas bacterianas a lo largo de un cultivo en condiciones AKI y se lisaron por congelación-descongelación repetitiva. Las muestras se ajustaron de acuerdo a determinaciones de proteína utilizando el reactivo Bio-Rad. La proteína TcpA se detectó con el anticuerpo monoclonal contra TcpA 20:2 (29). Los tiempos a los que se obtuvieron las alicuotas del cultivo se indican en la parte superior de la figura. Los periodos de incubación en fase estática o de agitación están indicados con flechas dobles.

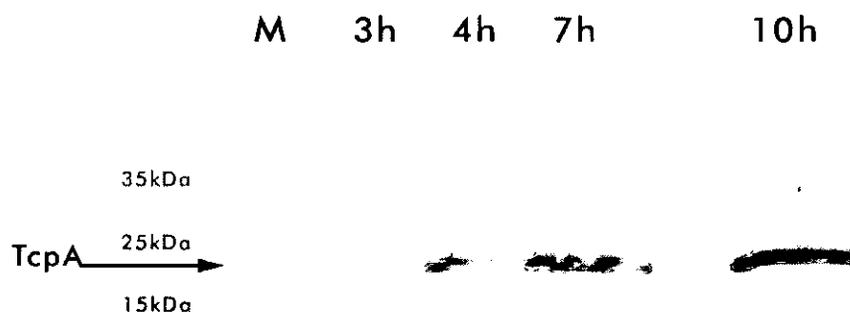


Figura 11. Western Blot para TcpA de *V. cholerae* E7946 en crecimiento estático prolongado. Las muestras de proteína se obtuvieron a partir de pastillas bacterianas recolectadas a las horas 3, 4, 7 y 10, de un cultivo en crecimiento estático prolongado. Las muestras se ajustaron de acuerdo a mediciones de proteína utilizando el reactivo Bio-Rad. La inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal contra TcpA de *V. cholerae* El Tor, TcpET 2:13 (S. Attridge). Se utilizó un marcador comercial de peso molecular (High Molecular Range Rainbow Marker, Amersham) para confirmar la posición esperada para la banda inmunorreactiva de TcpA (20.5 kDa).

Tabla 3. Determinación de CT en sobrenadantes de cultivo de la cepa E7946 en crecimiento con variaciones en las condiciones AKI.

Exp. ^a	Tiempo de crecimiento en fase estática	Tiempo de crecimiento en fase de agitación	[CT] μg/ml/A ₆₀₀
1)	4h en medio AKI	2h en el mismo medio AKI	1.039
2)	4h en medio AKI	5h en el mismo medio AKI	1.464
3)	4h en medio AKI	8h en el mismo medio AKI	1.976
4)	7h en medio AKI	2h en el mismo medio AKI	N/D ^b
5)	7h en medio AKI	5h en el mismo medio AKI	1.836
6)	12h en medio AKI	Ninguno	N/D
7)	4h en medio AKI	2h en medio AKI nuevo	2.765
8)	4h en medio AKI	2h en medio LB nuevo	0.464
9)	4h en medio LB	2h en medio LB nuevo	0.044

a: Número de experimento

b: Niveles no detectables de CT por GM1-ELISA

Se puede observar en la tabla que después de la fase de crecimiento estático estándar (4 horas), bastan 2 horas de agitación para poder detectar la producción y liberación de CT al sobrenadante de cultivo (experimentos 1, 7 y 8). También puede observarse que la producción de toxina es mucho más alta en medio AKI, ya que cuando se utiliza medio LB, la producción final de CT es aproximadamente 63 veces menor (comparar experimentos 7 y 9). Curiosamente, en el caso en que se alarga la fase estática a 7 horas, no se observan niveles detectables de CT al paso de dos horas de agitación, pero sí después de agitación por 5 horas, alcanzando un valor de 1.836 μg/ml.

El hecho de que la producción de CT se recupera al término de 5 horas de agitación sugiere la necesidad de síntesis *de novo* de ToxT seguida de activación. Una baja concentración de ToxT (aunque en estado inactivo para la activación de *ctxAB*) al término de las 7h de crecimiento estático, explicaría la falta de producción de CT después de 2h de agitación, en contraste con lo observado para el cultivo control (experimento 1).

En base a experimentos realizados previamente en el laboratorio, se había considerado la posibilidad de la existencia de un inductor extracelular que estimulase la síntesis de CT durante la fase de agitación. Se investigó el efecto de la sustitución del medio de cultivo por medio fresco al término de la fase estática para determinar si la activación de ToxT dependía de algún factor extracelular (Tabla 3). Los resultados de estos experimentos en los que al término de la fase estática las bacterias fueron resuspendidas en medio nuevo, demuestran aún una mayor producción de CT en el medio nuevo que en el cultivo control (comparar experimentos 1 y 7).

La agitación influye en la producción de CT

En la figura 12 se muestran los resultados para los niveles de CT encontrados en los sobrenadantes de los cultivos crecidos en diferentes condiciones, para la cepa VJ739 (pMT5). La cepa VJ739 (pToxT ET) se comportó de manera muy similar a la cepa VJ739 (pMT5), por lo que se omiten los resultados con respecto a la primera. Como se había observado antes, la cepa en cuestión produce CT aún en ausencia del inductor, IPTG, y de hecho, pareciera que éste inhibe un poco la síntesis de CT en las condiciones de crecimiento estático prolongado (Est. Prol.) y agitación desde el inicio del cultivo (Agit. Cont.) (Fig 12). En el caso de crecimiento bajo condiciones AKI se observa un nivel mayor de CT en presencia del inductor.

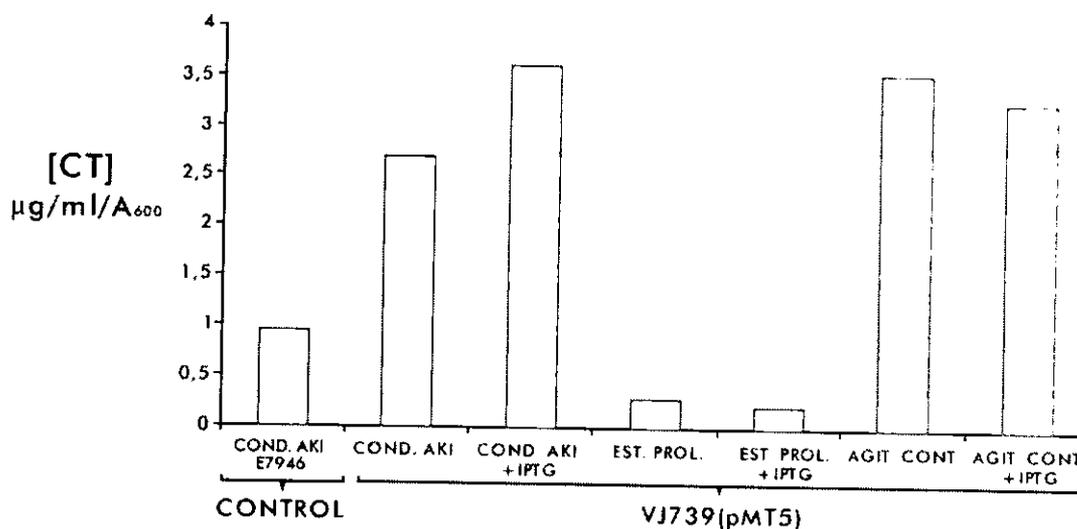


Figura 12. Producción de CT por la cepa VJ739(pMT5). La cepa de *V. cholerae* VJ739(pMT5) se creció en diferentes condiciones de cultivo (condiciones AKI y no-AKI), en presencia y ausencia del inductor (IPTG). Las condiciones no-AKI se refieren a los cultivos en crecimiento estático prolongado (EST. PROL.) o en agitación continua (AGIT. CONT.). La cepa E7946 se creció en condiciones AKI (COND. AKI) como control de la producción silvestre de CT en las cepas El Tor. Esta cepa no produce niveles detectables de CT bajo las condiciones de cultivo no-AKI. Los niveles de CT se detectaron por medio de GM1-ELISA en alícuotas de sobrenadante de cultivo colectadas a la hora 8. Los valores para la concentración de CT se reportan como equivalentes de estándar de CT por unidad de volumen de sobrenadante, ajustados de acuerdo a la lectura de absorción a 600nm de cada uno de los cultivos ([CT] $\mu\text{g/ml/A}_{600}$). Los resultados indican que estando presente ToxT, la agitación es necesaria para la producción de CT.

DISCUSSION

La producción de CT por *V. cholerae* El Tor en crecimiento bajo condiciones AKI ha sido tema de experimentos recientes enfocados a explicar la función del regulador positivo ToxT en la expresión de *ctxAB* (15). En este trabajo se da evidencia de una regulación muy precisa de la producción de ToxT debido a la activación por ToxR. En este trabajo se reporta activación transitoria de la transcripción del gen *toxT* por ToxR. Esta activación transitoria no se detectó en estudios anteriores debido a que los otros investigadores no monitorearon la transcripción de *toxT* a lo largo del cultivo como nosotros, sino que tomaron sólo muestras al final del período de incubación (15). La transcripción transitoria aparentemente sucede en respuesta a la combinación del crecimiento en fase estática y la densidad celular del cultivo, ya que la inducción ocurrió durante el periodo estático y en la fase estacionaria temprana. Estos resultados correlacionan con los estudios fisiológicos iniciales realizados por Iwanaga y colaboradores, quienes mostraron que un cultivo estático de 4 horas seguido por aereación vigorosa es óptimo para estimular la producción de CT en *V. cholerae* El Tor (26,27).

En este trabajo se encontró que la transcripción de *toxT* dependiente de ToxR se inició precisamente a la hora 4, aunque la expresión fue temporal, continuando solo por una hora durante la agitación. Este resultado indicó que ToxR es incapaz de sostener su efecto positivo sobre la transcripción de *toxT*. Aparte de esto, la transferencia de los cultivos a la agitación estimuló la transcripción de *ctxAB* junto con la aparición de CT en el sobrenadante de cultivo. Interesantemente, cuando los cultivos se mantuvieron en crecimiento estático, el producto de P.E. para *toxT* también desapareció después de la hora 5 (Fig 7). Este hallazgo indicó que ToxR es incapaz de mantener su regulación positiva sobre *toxT* también cuando la fase estática de crecimiento se prolonga. Por lo tanto, la regulación positiva de *toxT* por ToxR parece ocurrir sólo durante una ventana fisiológica corta en el tiempo que es sensible ya sea a la aereación vigorosa o al crecimiento estático prolongado.

Aquí se propone que la estimulación transitoria por ToxR involucra un cambio en su habilidad para activar el promotor de *toxT*, y no una modulación de la expresión del gen *toxR*, ya que los experimentos de inmunodetección mostraron que la proteína ToxR está presente a lo largo del cultivo en condiciones AKI (Fig 8). El hecho de que

ToxR se encontró después de la hora 6 es especialmente importante, ya que a partir de este tiempo no se detectó la transcripción de *toxT* activada por ToxR en los experimentos de P.E. (Fig 6). Estos resultados correlacionan con el reporte previo de la expresión de ToxR en vibrios El Tor independientemente de las condiciones de cultivo (15).

Un modelo sencillo para explicar el control transcripcional de *toxT* desde su promotor cercano sería el de un cambio ("switch") de encendido/apagado ("on/off") para la actividad de ToxR (ToxR/S) (Fig 13). En este modelo de "switch" proponemos que a las horas 4 y 5 ToxR está en su condición de encendido (activo) y que la agitación, o el crecimiento estático prolongado más allá de este punto, induce el estado apagado (inactivo) (Fig 13). Puede proponerse que los cambios entre los estados activo e inactivo involucran cambios entre las especies moleculares monomérica y diméricas ToxR-ToxR y/o ToxR-ToxS (13,50). De cualquier manera, la inducción o desactivación de ToxR puede requerir la participación de otros reguladores, ya que los simples cambios entre los estados monomérico y dimérico no parecen ser esenciales para la respuesta de ToxR a cambios en el medio ambiente en las cepas de biotipo clásico (50). En lugar de, o aún por encima de la dimerización, es probable que el encendido/apagado de ToxR tenga que ver con la acción de otros reguladores. TcpP y TcpH parecen los candidatos ideales para explicar la respuesta de ToxR en el fenómeno AKI.

Tanto TcpP como TcpH regulan la actividad de ToxR, como lo demuestra el hecho de que existen mutaciones en *tcpH* que resultan en transcripción no-detectable o muy reducida de *toxT* dependiente de ToxR y por consiguiente de la síntesis de CT en la cepa de *V. cholerae* clásico O395 (5,70). Por otra parte, se ha demostrado que TcpP estimula la transcripción de *toxT* (22). Más aún, se ha observado un efecto sinérgico positivo en la transcripción de *toxT* cuando ambos reguladores, TcpP y TcpH, están presentes en la célula (22,44). Evidencia para un efecto directo de TcpP (o TcpP/H) sobre la transcripción de *toxT* proviene del análisis de las mutantes *tcpP* de la cepa clásica O395 que mostró que la transcripción de *toxT* dependiente de ToxR normalmente requiere la acción conjunta de ambos TcpP y ToxR (36,70). En

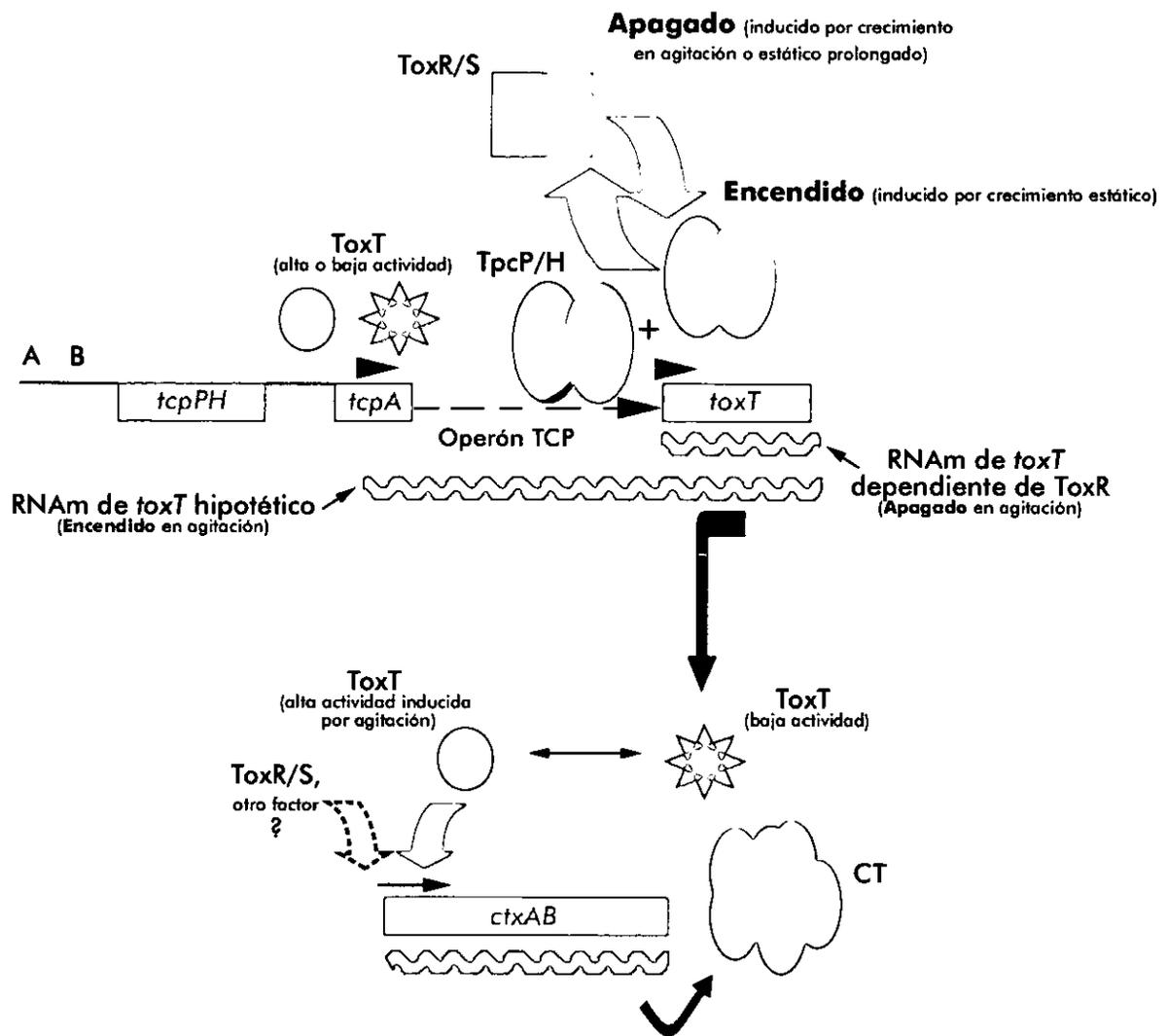


Figura 13. Modelo hipotético para la función de ToxR y ToxT en la respuesta de *V. cholerae* El Tor a las condiciones AKI. Las cajas representan genes y las flechas sobre ellas indican promotores así como la dirección de la transcripción. La flecha discontinua representa los genes localizados entre *tcpA* y *toxT* en el operón TCP (3). Las líneas onduladas simbolizan RNAs mensajeros. Las demás flechas indican estados de transición entre los estados de ToxR y ToxT o la traducción de algún RNAm. Se incluye una representación diagramática de la CT. El estado activo postulado de ToxR (ToxR/S), inducido por el crecimiento estático, se indica como un par de óvalos; el estado inactivo postulado, inducido por el cambio a agitación o por crecimiento estático prolongado, está representado por el par de rectángulos. Se indica la participación de TcpP/H promoviendo el estado activo de ToxR sobre el promotor de *toxT* (5,22,35,44,70). Se incluye la participación de AphA y AphB, representados como los círculos A y B, en la activación del promotor de *tcpPH*. Se ha propuesto que estas proteínas activan la expresión de *tcpPH* en respuesta a los estímulos ambientales adecuados para la expresión del regulón ToxR. También se propone un cambio entre los estados de baja y alta actividad para la proteína ToxT, el cual es inducido por la agitación. El estado de baja actividad propuesto está representado por una estrella y la forma de alta actividad se muestra representada como un círculo relleno sobre los promotores de *tcpA* y *ctxAB*, para indicar su función como inductor transcripcional de ambos operones (4,15). La contribución potencial de ToxR/S u otro factor en la expresión de *ctxAB* se indica con una flecha discontinua sobre su promotor.

vista de esto, es posible que el "switch on/off" propuesto en este trabajo involucre a TcpP, probablemente a través de interacciones proteína-proteína y por formación de un complejo TcpP/H-ToxR/S.

Si el estado activo de ToxR/S depende de la participación de TcpP/H entonces la activación transitoria de *toxT* podría depender de un nivel de regulación anterior, ya que la expresión de *tcpPH* se encuentra regulada por otra pareja de proteínas, AphA y AphB (34,61). En este momento, no es posible concluir si AphA y AphB tienen una función en la respuesta a las condiciones AKI. La regulación de la expresión de *tcpPH* podría, de hecho, depender de la secuencia nucleotídica del promotor de *tcpPH*, y ello ser la razón de las diferencias en el control de la expresión del regulón ToxR en ambos biotipos (35). Se encontraron diferencias en la secuencia nucleotídica en 4 posiciones de la región promotora, y se identificó el cambio de una sola base: A, en la posición -65 del promotor *tcpPH* clásico por una G, en el promotor *tcpPH* El Tor, como crucial para la activación por AphB (35). AphB se pega muy eficientemente al promotor de *tcpPH* clásico bajo diferentes condiciones de cultivo (LB, pH 6.5 y 30°C; condiciones AKI) y esto parece deberse a la presencia de la A en la posición -65 (35). En *V. cholerae* El Tor crecido bajo condiciones AKI AphB debe sentir alguna señal que no se conoce claramente (podría ser el pH), y que favorece que éste se pegue al promotor de *tcpPH*, aún cuando se encuentra una G en la posición -66.

Independientemente de si la activación transitoria de *toxT* depende finalmente de AphA/B, es necesario explicar por qué a pesar de esto, existe producción continua de CT. De acuerdo a trabajos previos, la transcripción sostenida de *ctxAB* observada (Fig. 3), a pesar de la reducción o ausencia de la transcripción de *toxT* dependiente de ToxR, podría explicarse por una acción directa de ToxR sobre el promotor de *ctxAB* (11,43). No obstante, existe evidencia de que bajo las condiciones usadas ToxR no activa directamente la transcripción de *ctxAB* en *V. cholerae*, sino que se requiere de ToxT para ello (5,15). En este trabajo se apoya que no existe actividad independiente de ToxR sobre *ctxAB* ya que la cepa VJ739 (6), mutante de la cepa El Tor E7946 con fenotipo ToxT⁻, fue incapaz de producir CT en un cultivo crecido en condiciones AKI. Esto implica la necesidad de la presencia de ToxT en la célula

para inducir la transcripción de *ctxAB* aún después de la transcripción transitoria.

Las concentraciones sostenidas de ToxT pueden deberse a transcripción de bajo nivel del promotor dependiente de ToxR que no fueron detectadas por nuestros procedimientos. Sin embargo, esta posibilidad no es consistente con la fuerte transcripción de *ctxAB* observada (Fig 6), la cual sugiere que se requiere de síntesis de proteína de *ново* para mantener los niveles de ToxT en la célula. Aún cuando se podría proponer que no haría falta la síntesis de *ново* de ToxT para explicar la transcripción sostenida de *ctxAB*, hay argumentos fuertes en contra de esa propuesta. Primero, ToxT se diluiría debido al incremento en masa durante el crecimiento, lo cual implicaría una relación inversa entre la actividad de ToxT y la concentración de proteína en la célula. Segundo, se ha visto que ToxT es altamente lábil en esquemas de purificación aplicados a cepas clásicas de *V. cholerae* (15), lo cual sugiere que la proteína es inherentemente inestable y, por tanto, que la concentración de ToxT disminuiría rápidamente en la célula. Una alternativa para explicar la producción de ToxT independiente de la transcripción transitoria dependiente de ToxR sería que existiese un mensaje alterno para *toxT* que proviene de la transcripción a partir de un promotor distinto.

Un promotor localizado 12.6 kb río-arriba del gen *toxT* y previo al gen *tcpA* y los primeros 12 genes contiguos en el operón TCP, ha sido propuesto como candidato para generar un RNAm largo que incluye a *toxT* en la cepa clásica O395 (4). Aunque no se ha demostrado formalmente la existencia de un transcrito de 12-13 kb de largo, a través de experimentos de protección con RNasa se ha demostrado la existencia de un transcrito, dependiente del promotor de *tcpA*, que contiene tanto los transcritos de *tcpF* como el de *toxT* (4). Aunado a esto, ya que ToxT activa a *tcpA*, se ha propuesto que esto representa un mecanismo de autorregulación para ToxT (4,70). Lo anterior va de acuerdo con la observación reciente de que el promotor de *tcpA* en O395 se requiere para la máxima transcripción de *toxT* y producción de CT (70). El hecho de que las condiciones de crecimiento AKI también estimulan la síntesis de TCP en los vibrios El Tor, apoya la anterior propuesta (15,30).

En este trabajo se muestra evidencia que apoya el modelo de autorregulación de la transcripción de *toxT* desde el promotor de *tcpA*. Se detectó

un transcrito del gen estructural *toxT* por RT-PCR en los tiempos de cultivo en los que ya no era detectable el producto de P.E. para el transcrito de *toxT* dependiente de ToxR (Fig 9, horas 6 a 10). Es muy probable que este mensaje se origina en *tcpA*, pero los intentos para demostrarlo mediante RT-PCR, usando enzimas comerciales diseñadas especialmente para obtener productos mayores a 12 kb (Expand RT-PCR Kit, Boehringer-Manheim), no dieron resultado. Creemos que esta falla se debe a procesamiento del RNAm en sitios internos dentro del operón TCP y/o a que se trata de un transcrito de vida corta (4).

En vista de esta dificultad, y considerando que la expresión de *tcpA* en O395 correlaciona con la transcripción del operón completo, incluyendo a *tcpJ*, gen posterior inmediato a *toxT* (4), se analizó la presencia de la proteína TcPA por experimentos de "dot-blot". Se encontró que la inducción de la producción de TcPA (Fig 10) coincide con la inducción de la transcripción de *ctxAB* a través de la fase de cultivo en agitación. Este hallazgo apoya la existencia de un mensaje policistrónico que contiene a *toxT* y concuerda completamente con experimentos de P.E. realizados por nuestros colaboradores que muestran que *tcpA* se transcribe muy poco antes de la hora 4, que la transcripción aumenta a la hora 4 y que, después de este punto, el nivel de ésta se mantiene durante el resto del cultivo (42).

Para apoyar aún más esta propuesta, se intentó detectar por RT-PCR la presencia de un RNAm que incluyese a *tcpF*, gen que antecede a *toxT*, la región intergénica entre ambos y el inicio del gen *toxT*. Se obtuvo un producto de amplificación >1 kb a las horas 4, 6 y 8, en muestras de un cultivo crecido bajo condiciones AKI, siendo de aproximadamente 1.3 kb el producto de PCR esperado. Estos resultados apoyan la presencia de un RNAm policistrónico que incluye a *toxT* y que probablemente se origina en *tcpA*.

Para determinar si la regulación de la expresión del TCP está sujeta a las mismas condiciones de cultivo que regulan la expresión de la CT, se determinó la producción de TcPA bajo condiciones de crecimiento estático prolongado. En estas condiciones no hay inducción de la transcripción de *ctxAB* y consideramos importante determinar si el TCP era regulado de la misma forma. Habiendo obtenido un MAb

específico para TCP de El Tor (MAb TcpET 2:13, regalo del Dr. S. Attridge), se realizó Western Blot para las muestras de proteína obtenidas a varios tiempos de un crecimiento estático prolongado. Se observó la aparición de una banda inmunorreactiva a la hora 4 y que se mantiene a un nivel esencialmente constante a las horas 7 y 10 del cultivo. Como se vió anteriormente, empieza a haber transcripción de *toxT* a partir de la hora 4 (dentro de la fase estática) y es entonces cuando aparece una banda para TcpA. A diferencia del experimento de dot-blot, donde la intensidad de la banda de TcpA es menor a la hora 4 que a la hora 5 y subsecuentes (5h, Fig 10), aquí se observan bandas de intensidad muy similar (Fig 11). Esto sugiere que la agitación induce una mayor expresión de TcpA y quizá del operón TCP incluyendo a *toxT*. Así, durante el cultivo estático prolongado parece haber una inducción basal del promotor de *tcpA* y esta expresión se sostiene a lo largo del cultivo.

¿Cómo es que la agitación de los cultivos induce la transcripción de *ctxAB*? Esta es una pregunta difícil de contestar experimentalmente, pero aquí se especula que exista, igual que para ToxR/S, un "switch on/off" para la actividad de ToxT. Es necesario proponer un sistema de encendido/apagado para ToxT porque aún cuando existe expresión de *toxT* en crecimiento estático prolongado, no hay producción de CT en el cultivo si no existe la fase de agitación. No obstante, ya que sin agitación hay expresión de *tcpA*, ToxT parece capaz de activar a *tcpA* pero no a *ctxAB*. Así, el "switch" de encendido/apagado podría generar una forma "encendida" de alta actividad (que activa a *tcpA* y a *ctxAB*) y una forma "apagada" de baja actividad (que activa sólo a *tcpA*).

Para determinar si la activación de ToxT en un cultivo AKI era afectada por la duración de la fase estática se realizaron experimentos en los que ésta se prolongó a 7 horas, antes de someter el cultivo a la agitación. Una fase estática de 7h permitió aún la activación de ToxT y la síntesis de CT. Curiosamente, después de la fase estática de 7h la agitación no condujo de inmediato a la síntesis de CT, ya que si se analiza una alícuota a las 2h de iniciada la agitación no se detecta la toxina. La producción de CT tiene lugar más tarde, pues si se continúa la agitación se encuentra un nivel alto de CT a las 5h (Tabla 3). El significado de estos resultados es difícil de interpretar pero podría ocurrir que el nivel de ToxT ha disminuído hasta

un punto crítico, en el cual no es posible detectar su efecto sobre la expresión de *ctxAB*. A medida que el cultivo progresa es probable que los niveles de ToxT suban de nuevo hasta que su efecto sobre *ctxAB* es evidente.

Para determinar si la activación de ToxT dependía de algún factor extracelular, se realizó sustitución del medio de cultivo por medio fresco y no se encontró evidencia de un factor en el medio condicionado que fuera esencial para la inducción de *ctxAB* (Tabla 3).

Considerando la propuesta de que la fase de agitación modifica a ToxT de tal manera que se encuentra en la condición "on", se decidió determinar si la actividad de ToxT en ausencia del control por ToxR, era afectada de la misma forma. Para ello, se hicieron experimentos con las cepas VJ739 (pMT5) y VJ739 (pToxT ET). Estas cepas tienen plásmidos que codifican para ToxT clásico (pMT5) (15) y ToxT El Tor (pToxT ET) (este trabajo) clonados en el vector pMMB66, bajo el control de un promotor inducible por IPTG. El plásmido pToxT ET se construyó a raíz de la observación de que la cepa transformada con el plásmido pMT5 produce la proteína aún en ausencia del inductor (expresión de escape). Cabe mencionar que no existen diferencias importantes entre las secuencias de las proteínas ToxT de ambos biotipos, por lo que en ambos casos, se obtuvieron prácticamente los mismos resultados.

Se hicieron cultivos en condiciones de crecimiento estático prolongado y se observó que a pesar de expresar ToxT, las cepas producían niveles muy reducidos y casi no detectables de CT (Fig 12). Esto sugiere que ToxT se sintetiza en un estado que es incapaz de activar la transcripción de *ctxAB* eficientemente, es decir, un ToxT en la condición "off". La agitación activaría a ToxT (condición "on") y con ello se iniciaría la transcripción de *ctxAB*. Una activación por la agitación sería congruente con el hecho de que los cultivos en agitación desde el inicio producen muy buenos niveles de CT (Fig 12). Esto podría explicarse si el ToxT producido a partir del plásmido fuese continuamente activado por la agitación aún desde el inicio del cultivo.

Esta hipótesis se resume en el modelo presentado en la Figura 13. El modelo incluye los mecanismos discutidos anteriormente de "on/off" para ToxR y ToxT y

propone que la respuesta de *V. cholerae* El Tor a las condiciones AKI se deben a la función de ToxR y ToxT. Se incorporó al modelo la participación de los reguladores positivos TcpP y TcpH (5,22), indicando que ellos influyen en activar la función de ToxR (ToxR/S) sobre el promotor de *toxT* (Fig 13).

Falta por definir si la proteína CRP en complejo con AMPc y TcpI, ambos reguladores negativos del operón TCP en cepas clásicas (59,60), contribuyen al nivel estacionario final de ToxT en los vibrios El Tor.

En términos de la relevancia biomédica de los resultados presentados aquí, es claro que la respuesta de *V. cholerae* El Tor a los estímulos externos parece exquisitamente sensible y más apropiadamente diseñada para sintetizar CT sólo cuando se presentan ciertas condiciones de cultivo. Tales condiciones parecen incluir el estado de la población bacteriana en el intestino (28), en analogía al "quorum sensing" en bacterias filogenéticamente relacionadas (2). Si la expresión de los genes de virulencia refleja los eventos durante la infección, se puede suponer que los vibrios El Tor no producen CT continuamente sino en etapas. Cada etapa ocurriría en el punto en el cual la multiplicación bacteriana y el consumo de nutrimentos dentro del intestino han llevado a las condiciones equivalentes a aquellas al crecimiento en condiciones AKI.

Lee y colaboradores han propuesto un modelo de regulación de la expresión de la CT y el TCP durante la infección, en el cual la activación de los factores de virulencia se presenta en forma secuencial (38). Primero, los vibrios son expuestos a alguna señal en los lúmenes del estómago y del intestino delgado superior que activa a ToxR y TcpP (0-1 h), los cuales funcionan en conjunto para inducir la transcripción de *tcpA* (por medio de ToxT). El incremento en las concentraciones de TcpA, así como de otras proteínas codificadas por el operón TCP, inicia la producción del TCP en la superficie bacteriana (2-3 hs). El TCP producido es necesario para la exposición subsecuente de los vibrios a una nueva señal cerca de las microvellosidades del intestino, lo que hace que se incremente la proporción de ToxR activo (y probablemente TcpP). El aumento de ToxR activo y los niveles aumentados de ToxT, tienen como consecuencia un incremento en la producción del TCP. Subsecuentemente, ToxR y ToxT actúan en conjunto para inducir la

transcripción de *ctxAB*, resultando en la producción de la CT (>4hs). En este modelo, los factores de virulencia se expresan secuencialmente durante la infección, y la expresión de *ctxAB* es dependiente de la expresión previa de *tcpA*, por lo que la producción de la CT ocurre después y es dependiente de la colonización (38).

La producción de la CT, con su actividad de secreción de líquido, arrastraría a las bacterias fuera del intestino y los vibrios remanentes reiniciarían el ciclo de crecimiento. Las bacterias recién multiplicadas serían arrastradas de nuevo cuando estén presentes las mismas condiciones. No está claro como esto podría ser ventajoso para los vibrios, pero si la síntesis inicial de la CT ocurre a densidades bacterianas relativamente bajas, como se ha visto *in vitro*, las cantidades de CT en el interior del intestino también serían relativamente bajas en el tiempo en que las bacterias son expelidas. Esto puede resultar en una infección menos agresiva, que entonces podría ayudar a explicar por qué los vibrios El Tor ocasionan una enfermedad menos severa, con una proporción mayor de casos asintomáticos que en los casos ocasionados por las cepas clásicas (14). Otra posibilidad sería que la enfermedad sea menos severa porque las bacterias no encuentran en el intestino las condiciones óptimas para sintetizar la toxina, como lo son las condiciones AKI, *in vitro*, para la máxima producción de CT por los vibrios El Tor.

Una ventaja ecológica teórica derivada de una enfermedad menos severa es que si los individuos infectados por El Tor son debilitados en menor proporción, pueden diseminar más fácilmente a los vibrios en el medio ambiente (19). Una diseminación más eficiente podría explicar por qué el biotipo El Tor se ha dispersado rápidamente a través del mundo en las últimas décadas. Con respecto a esto último, es de notar que la cepa patogénica más reciente de *V. cholerae*, la cepa O139, comparte muchas características con *V. cholerae* El Tor, incluyendo la necesidad de crecimiento en condiciones AKI para producir CT (67).

CONCLUSIONES

- I)** *Vibrio cholerae* El Tor requiere de las condiciones AKI para producir CT.
- II)** La transcripción de *toxT* dependiente de ToxR se inicia a la hora 4 de crecimiento estático únicamente, es decir, esto no sucede en los cultivos que han sido agitados desde el inicio.
- III)** La transcripción de *toxT* desde su promotor cercano se detiene después de la hora 5 de cultivo, independientemente de si el cultivo es transferido a la fase de agitación (condiciones AKI) o es mantenido en crecimiento estático.
- IV)** La expresión del operón *ctxAB* es inducida únicamente bajo condiciones AKI y esto sucede a partir de la hora 5 del cultivo (fase de agitación).
- V)** La proteína ToxR se encuentra presente durante el cultivo en condiciones AKI, pero solamente activa la expresión de *toxT* en las horas 4 y 5 del cultivo, por lo que, aparentemente, sucede un cambio en su actividad sobre este promotor.
- VI)** La expresión de *tcpA* se induce paralelamente a la expresión de *ctxAB* en un cultivo crecido en condiciones AKI.
- VII)** En crecimiento estático prolongado se encuentra la presencia de TcpA a partir de la hora 4 (cuando aparece el transcrito para *toxT*) y se mantiene a niveles esencialmente constantes durante todo el cultivo.
- VIII)** Al parecer, la fase de agitación de un cultivo crecido bajo condiciones AKI, influye positivamente en la actividad de ToxT sobre los promotores de *ctxAB* y *tcpA*.

PERSPECTIVAS

- I)** ToxR posee un residuo D en el dominio homólogo al dominio donde es fosforilado el residuo D de la proteína Hila (regulador de respuesta), por lo que sería interesante investigar si la posible fosforilación de ToxR afecta su actividad sobre el promotor de *toxT*. En caso de ser así, identificar al factor que le transfiere a ToxR el grupo fosfato.
- II)** Determinar si la activación de *tcpA* en la fase estática de un cultivo tipo AKI, y en crecimiento estático prolongado, se debe a una baja concentración de ToxT o si sucede, como se propone aquí, que ToxT permanece en un estado de baja actividad en ausencia de la fase de agitación.
- III)** Determinar si ToxT efectivamente interacciona con ToxR u otro factor, aún no identificado (otra molécula de ToxT, otra proteína reguladora diferente a ToxR, alguna molécula pequeña), en la fase de agitación de los cultivos tipo AKI para activar al promotor de *ctxAB*.
- IV)** Con respecto a los resultados mostrados en la Tabla 3, sería interesante identificar el motivo por el cual, la sustitución del medio de cultivo después de las 4h de la fase estática por medio de cultivo nuevo, da como resultado una mejor producción de CT por la cepa E7946.
- V)** También será de utilidad determinar si la recuperación de la síntesis de CT a las 5h de agitación posteriores a 7h de fase estática, responde a la síntesis *de novo* de ToxT, o más bien responde al número de cuentas viables de bacterias al término de 7h en crecimiento estático en comparación con 4h, que es el tiempo recomendado para la fase estática según las condiciones de cultivo tipo AKI.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

1. **Atlung T. and H. Ingmer.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**:7-17
2. **Bassler, B.L., E.P. Greenberg and A.M. Stevens.** 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **179**: 4043–4045.
3. **Bradford, A.K., C.A. Bopp and J.G. Wells.** 1994. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* 01 from faecal specimens. *Vibrio cholerae* and Cholera. Molecular to Global Perspectives. ASM Press. pp. 3-25.
4. **Brown, R.C. and R.K. Taylor.** 1995. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Mol. Microbiol.* **16**: 425–439.
5. **Carroll, P.A., K.T. Tashima, M.B. Rogers, V.J. DiRita and S.B. Calderwood.** 1997. Phase variation in *tcpH* modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 1099–1111.
6. **Champion, G.A., M.N. Neely, M. A. Brennan and V.J. DiRita.** 1997. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol. Microbiol.* **23**: 323–331.
7. **Chancey S.T., D.W. Wood and L.S. Pierson.** 1999. Two-component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2294-2299.
8. **Chiang S.L. and J.J. Mekalanos.** 1998. Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. *Mol. Microbiol.* **27**: 797-805.
9. **Crawford, J. A. and V.J. DiRita.** Datos no publicados.
10. **Crawford J.A., J.B. Kaper and V.J. DiRita.** 1998. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of *ompU*, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **29**: 235-246.
11. **DiRita, V.J.** 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 451–458.
12. **DiRita, V.J.** Datos no publicados.

13. DiRita, V.J. and J.J. Mekalanos. 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* **64**: 29–37.
14. DiRita, V.J., C. Parsot, G. Jander and J.J. Mekalanos. 1991. Regulatory cascade controls virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5403–5407.
15. DiRita, V.J., M. Neely, R.K. Taylor and P.M. Bruss. 1996. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7991–7995.
16. Dubey, R.S., M. Lindblad and J. Holmgren. 1990. Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1839–1847.
17. Dziejman M. and J.J. Mekalanos. 1994. Analysis of membrane protein interaction: ToxR can dimerize the amino terminus of phage lambda repressor. *Mol. Microbiol.* **13**: 485-494.
18. Dziejman M., H. Kolmar, H.J. Fritz and J.J. Mekalanos. 1999. ToxR co-operative interactions are not modulated by environmental conditions or periplasmic domain conformation. *Mol. Microbiol.* **31**: 305-317.
19. Ewald, P.W. 1991. Waterborne transmission and the evolution of virulence among gastrointestinal bacteria. *Epidemiol. Infect.* **106**: 83–119.
20. Fürste, J.P. 1986. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multihost-range *tacP* expression vector. *Gene.* **48**:119-131.
21. Glass, R.I., S. Becker, I.M. Huq, B.J. Stoll, M.U. Khan, M.H. Merson, J.V. Lee and R.E. Black. 1982. Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966–1980. *Am. J. Epidemiol.* **116**: 959–970.
22. Häse, C.C. and J.J. Mekalanos. 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 730–734.

23. Higgins, D.E., E. Nazareno and V.J. DiRita. 1992. The virulence gene activator *ToxT* from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **174**: 6974–6980.
24. Higgins, D.E. and V.J. DiRita. 1994. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **14**: 17–29.
25. Higgins, D.E. and V.J. DiRita. 1996. Genetic analysis of the interaction between *Vibrio cholerae* transcription activator ToxR and *toxT* promoter DNA. *J. Bacteriol.* **178**: 1080–1087.
26. Iwanaga, M., K. Yamamoto, N. Higa, Y. Ichinose, N. Nakasone and M. Tanabe. 1986. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* **30**: 1075–1083.
27. Iwanaga, M. and T. Kuyyakanond. 1987. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 2314–2316.
28. Jobling, M.G. and R.K. Holmes. 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Mol. Microbiol.* **26**: 1023–1034.
29. Jonson, G., J. Holmgren and A.M. Svennerholm. 1991. Epitope differences in toxin-coregulated pili produced by classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* **11**: 179–188.
30. Jonson, G., A.M. Svennerholm and J. Holmgren. 1990. Expression of virulence factors by classical and El Tor *Vibrio cholerae* *in vivo* and *in vitro*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**: 221–228.
31. Kaper, J.B., A. Fasano and M. Trucksis. 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* and Cholera. Molecular to Global Perspectives. ASM Press. pp. 145–176.
32. Karaolis, D.K., J.A. Johnson, C.C. Bailey, E.C. Boedeker, J.B. Kaper and P.R. Reeves. 1998. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3134–3139.

- 33. Karaolis, D.K., S. Somara, D.R. Meneval Jr., J.A. Johnson and J.B. Kaper.** 1999. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. **399**: 375-379.
- 34. Kovacikova G. and K. Skorupski.** 1999. A *Vibrio cholerae* LysR Homolog, AphB, Cooperates with AphA at the *tcpPH* Promoter to Activate Expression of the ToxR Virulence Cascade. *J. Bacteriol.* **181**: 4250-4256.
- 35. Kovacikova. G. and K. Skorupski.** 2000. Differential Activation of the *tcpPH* Promoter by AphB Determines Biotype Specificity of Virulence Gene Expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **182**: 3228–3238.
- 36. Krukonis, E.S., R.R. Yu and V.J. DiRita.** 2000. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol. Microbiol.* **38**: 67-84.
- 37. Kumate J., J. Sepúlveda y G. Gutiérrez.** 1993. Cap 1. Origen e Historia de las pandemias (J. Kumate). Cap 2. John Snow y la epidemiología del cólera (J. Sepúlveda). Cap 3. El descubrimiento del microbio (J. Kumate). Cap. 7. Fisiopatología del cólera (J. Sánchez Castillo). El cólera: Epidemias, Endemias y Pandemias. Ed. Interamericana McGraw-Hill.
- 38. Lee, S.H., D.L. Hava, M.K. Waldor and A. Camilli.** 1999. Regulation and Temporal Expression Patterns of *Vibrio cholerae* Virulence Genes during Infection. *Cell* **99**: 625-634.
- 39. Li C.C., J.A. Crawford, V.J. DiRita and J.B. Kaper.** 2000. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **35**:189-203.
- 40. Martinez-Hackert E. and A.M. Stock.** 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J. Mol. Biol.* **269**: 301-312.
- 41. Medrano, A.I., V.J. DiRita, G. Castillo and J. Sanchez.** 1999. Transient Transcriptional Activation of the *Vibrio cholerae* El Tor Virulence Regulator ToxT in Response to Culture Conditions. *Infect. Immun.* **67**: 2178-2183.
- 42. Miller, A., V.J. DiRita and J. Sanchez.** Comunicación personal.

43. **Miller, V.L., R.K. Taylor and J.J. Mekalanos.** 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**: 271–279.
44. **Miller, V.L., V.J. DiRita and J.J. Mekalanos.** 1989. Identification of *toxS*, a regulatory gene whose product enhances ToxR-mediated activation of the cholera toxin promoter. *J. Bacteriol.* **171**: 1288-1293.
45. **Murley, Y.M., P.A. Carroll, K. Skorupski, R.K. Taylor and S.B. Calderwood.** 1999. Differential Transcription of the *tcpPH* Operon Confers Biotype-Specific Control of the *Vibrio cholerae* ToxR Virulence Regulon. *Infect. Immun.* **67**: 5117-5123.
46. **Murley, Y.M., J. Behari, R. Griffin and S.B. Calderwood.** 2000. Classical and El Tor Biotypes of *Vibrio cholerae* Differ in Timing of Transcription of *tcpPH* during Growth in Inducing Conditions. *Infect. Immun.* **68**: 3010-3014.
47. **Nye, M.B., J.D. Pfau, K. Skorupski and R.K. Taylor.** 2000. *Vibrio cholerae* H-NS Silences Virulence Gene Expression at Multiple Steps in the ToxR Regulatory Cascade. *J. Bacteriol.* **182**: 4295-4303.
48. **Ogierman, M.A., E. Voss, C. Meaney, R. Faast, S.R. Attridge and P.A. Manning.** 1996. Comparison of the promoter proximal regions of the toxin co-regulated *tcp* gene cluster in classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* **170**: 9–16.
49. **Otteman, K.M. and J.J. Mekalanos.** 1994. Regulation of cholera toxin expression. *Vibrio cholerae* and Cholera. Molecular to Global Perspectives. ASM Press. pp. 177-186.
50. **Otteman, K.M. and J.J. Mekalanos.** 1996. The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J. Bacteriol.* **178**:156–162.
51. **Otteman, K.M., V.J. DiRita and J.J. Mekalanos.** 1992. ToxR proteins with substitutions in residues conserved with OmpR fail to activate transcription from the cholera toxin promoter. *J. Bacteriol.* **174**: 6807-6814.
52. **Parsot C. and J.J. Mekalanos.** 1992. Structural analysis of the *acfA* and *acfD* genes of *Vibrio cholerae*: effects of DNA topology and transcriptional activators on expression. *J. Bacteriol.* **174**: 5211-5218.

53. Pearson, G.D., V.J. DiRita, M.B. Goldberg, S.A. Boyko, S.B. Calderwood, and J.J. Mekalanos. 1990. New attenuated derivatives of *Vibrio cholerae*. Res. Microbiol. **141**: 893–899.
54. Peterson, K.M. and J.J. Mekalanos. 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. Infect. Immun. **56**: 2822–2829.
55. Pfau J.D. and R.K. Taylor. 1998. Mutations in *toxR* and *toxS* that separate transcriptional activation from DNA binding at the cholera toxin gene promoter. J. Bacteriol. **180**: 4724–4733.
56. Priefer U.B., R. Simon and A. Puhler. 1985. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. J. Bacteriol. **163**: 324–330.
57. Sanchez, J. and J. Holmgren. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 481–485.
58. Schumacher, D.A. and K.E. Klose. 1999. Environmental Signals Modulate ToxT-Dependent Virulence Factor Expression in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **181**: 1508–1514.
59. Skorupski, K. and R.K. Taylor. 1997. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin co-regulated pilus in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 265–270.
60. Skorupski, K. and R. K. Taylor. 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. Mol. Microbiol. **25**: 1003–1009.
61. Skorupski, K. and R.K. Taylor. 1999. A new level in the *Vibrio cholerae* ToxR virulence cascade: AphA is required for transcriptional activation of the *tcpPH* operon. Mol. Microbiol. **31**: 763–771.
62. Svennerholm, A.M. and J. Holmgren. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. **1**: 19–23.
63. Svennerholm, A.M., M. Wikström, L. Lindholm and J. Holmgren. 1986. Monoclonal antibodies and immunodetection methods for *Vibrio cholerae* and *Escheri-*

chia coli, p. 77–95. In A. J. Macario et al. (ed.), *Monoclonal antibodies against bacteria*, vol. III. Academic Press, New York, N.Y.

64. Taylor, R.K., V.L. Miller, D.B. Furlong and J.J. Mekalanos. 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2833–2837.
65. Thomas, S., S.G. Williams and P.A. Manning. 1995. Regulation of *tcp* genes in classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* **166**: 43–48.
66. Trucksis, M., J. Michalski, Y.K. Deng and J.B. Kaper. 1998. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14464–14469.
67. Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos. 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect. Immun.* **62**: 72–78.
68. Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910–1914.
69. Wong, S.M., P.A. Carroll, L.G. Rahme, F.M. Ausubel and S.B. Calderwood. 1998. Modulation of Expression of the ToxR Regulon in *Vibrio cholerae* by a Member of the Two-Component Family of Response Regulators. *Infect. Immun.* **66**: 5854–5861.
70. Yu, R.R., and V.J. DiRita. 1999. Analysis of an Autoregulatory Loop Controlling ToxT, Cholera Toxin, and Toxin-Coregulated Pilus Production in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **181**: 2584–2592

ANEXO

Transient Transcriptional Activation of the *Vibrio cholerae* El Tor Virulence Regulator ToxT in Response to Culture Conditions

ANA I. MEDRANO,^{1,2} VICTOR J. DIRITA,³ GABRIELA CASTILLO,² AND JOAQUIN SANCHEZ^{1,2*}

Facultad de Medicina, UAEM, Cuernavaca, Morelos, Mexico 62210,¹ Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, INSP, Cuernavaca, Morelos, Mexico 62508,² and Unit for Laboratory Animal Medicine and Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109³

Received 18 November 1998/Returned for modification 12 January 1999/Accepted 9 February 1999

Vibrio cholerae El Tor require special in vitro culture conditions, consisting of an initial static growth period followed by shift to shaking (AKI conditions), for expression of cholera toxin (CT) and toxin coregulated pilus (TCP). ToxT, a regulator whose initial transcription depends on the ToxR regulator, positively modulates expression of CT and TCP. To help understand control of CT and TCP in El Tor vibrios, we monitored *ctxAB* and ToxR-dependent *toxT* transcription by time course primer extension assays. AKI conditions stimulated CT synthesis with an absence of *ctxAB* transcription during static growth followed by induction upon shaking. ToxR-dependent *toxT* transcription was induced at the end of the static growth period but was transient, stopping shortly after shaking was initiated but, interestingly, also if the static phase was prolonged. Immunoblot assays showed that ToxR protein levels were not coincidentally transient, implying a protein on/off switch mechanism for ToxR. Despite the transient activation by ToxR, transcription of *ctxAB* was maintained during shaking. This finding suggested continued *toxT* expression, possibly through relay transcription from another promoter. The 12.6-kb distant upstream *tcpA* promoter responsible for expression of the TCP operon has been proposed to provide an alternate *toxT* message by readthrough transcription. Activation of the *tcpA* promoter is supported by increased expression of TcpA protein during the shaking phase of the culture. Readthrough transcription of *toxT* from *tcpA* would be compatible with reverse transcription-PCR evidence for a *toxT* mRNA at times when ToxR-dependent transcription was no longer detectable by primer extension.

Cholera is caused by the human pathogen *Vibrio cholerae* O1, a gram-negative bacterium that colonizes the small intestine of its host. It is known that environmental stimuli affect the control of virulence gene expression in *V. cholerae*. It has been theorized that the function of this regulation may be to optimize energy expenditure for vibrios to achieve a successful infection. One of the most important *V. cholerae* virulence factors is cholera toxin (CT). CT is the main factor responsible for the abundant fluid loss that characterizes the disease. CT is a prototype ADP-ribosylating enterotoxin encoded by the *ctxAB* operon, which resides in the genome of a filamentous, lysogenic phage called CTX ϕ (35). In addition to CT, there are other virulence factors associated with the pathogenicity of *V. cholerae*, whose expression is coordinately regulated by an activator called ToxR (7, 9, 32). Because of this coordinated regulation, genes controlled by ToxR are collectively termed the ToxR regulon (26). It has been proposed that ToxR, which is a membrane-located transcriptional activator, mediates regulation of virulence gene expression in response to external changes in osmolarity, nutrients, and pH (8). Proof of the important role of ToxR is that strains with null mutations in *toxR* are deficient in virulence factor production and are avirulent (25). Reduction in virulence factor expression has now been shown to be due largely to the inability to produce a second regulator, ToxT, which is considered the direct effector of most of the ToxR-regulated transcription. This has led to

the proposal of a cascade model to explain virulence gene regulation in *V. cholerae* (9). ToxT is an AraC-like protein that activates several virulence genes in the ToxR regulon (9, 29). The carboxyl-terminal domain of ToxT has a helix-turn-helix motif, characteristic of this family of activators, but its amino terminus does not show significant similarity to other AraC-like proteins (14). Although early work (7, 22) suggested that both ToxR and ToxT independently activate transcription of *ctxAB*, more recent work indicates *ctxAB* is activated solely by ToxT in *V. cholerae*, raising a question of the precise role of ToxR in *ctxAB* control (5, 10). ToxT also controls the expression of the toxin coregulated pilus (TCP) and of the accessory colonization factor (*acf*) genes (9).

The *toxT* gene possesses one proximal ToxR-dependent promoter. Sequences within this promoter contain a specific binding site for the ToxR protein, as shown by in vitro gel shift and footprinting experiments (5a, 16). Apart from the proximal *toxT* promoter, a second message for ToxT can be generated from the distal *tcpA* promoter that controls expression of the TCP gene cluster, which includes the *toxT* gene itself (2, 36). The finding of decreased *toxT* mRNA levels in a *tcpA* promoter mutant (36) supports *toxT* transcription from this promoter. Because ToxT induces *tcpA* expression, transcriptional readthrough from this promoter provides a self-regulatory mechanism for *toxT* (2, 36).

The two major biotypes of *V. cholerae*, classical and El Tor, each require ToxR and ToxT for activation of virulence factors, and potential regulatory sequences are largely conserved between the two biotypes. Nevertheless, the mechanism controlling expression of *toxT* appears to be biotype specific (10), because classical strains express CT and TCP under a wide

* Corresponding author. Mailing address: Facultad de Medicina, UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. Mexico 62210. Phone: (52) 73 297009. Fax: (52) 73 297031 E-mail: joaquin.sanchez@microbio.gu.se.

range of experimental conditions, while El Tor strains require specific growth conditions, termed AKI, for detectable expression of the ToxR regulon (10, 17, 21). Such conditions comprise a biphasic culture where vibrios are first statistically grown for a 4-h period and then shifted to shaking (17). The recent finding that *toxT* expression from the inducible *tacP* promoter in El Tor makes CT synthesis essentially independent of AKI culturing immediately suggested a direct involvement of the ToxR/ToxT system (10). In classical strains, which have more permissive growth requirements for expression of the ToxR regulon, the relative contributions of ToxR and ToxT to transcription of *toxT* have been thoroughly analyzed (36), but analysis of how ToxR and ToxT participate in modulating *toxT* and *ctxAB* transcription under AKI culture conditions is not known. To gain insight into the molecular basis for control of CT and TCP production in *V. cholerae* El Tor, we performed experiments analyzing *toxT* and *ctxAB* transcription over time during AKI growth.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Strains were maintained at -70°C in LB medium containing 20% glycerol. The classical *V. cholerae* strain O395 was grown at 30°C in LB medium, and the *V. cholerae* El Tor strain E7946 was grown at 37°C in AKI medium (17) without sodium bicarbonate (18). The classical strain was used to generate a *toxT* primer extension product used as a reference to estimate the sizes of the *toxT* and *ctxA* primer extension products from the El Tor strain.

RNA isolation and primer extensions. To isolate RNA from the classical strain, bacteria were harvested from cultures prepared by a 1:100 dilution of an overnight culture into 50 ml of fresh LB medium for growth under orbital shaking for 2 to 5 h at 30°C . For RNA isolation from the El Tor bacteria, scaled-up cultures (11) were used so as to obtain sufficient material from the early time points and from low-density cultures. Scaled-up cultures designed to be equivalent to 10-ml cultures in 15- by 150-mm tubes (17) were carried out with 500-ml medium volumes placed in a 500-ml cylinder. Medium was inoculated with a 100- μl volume of a bacterial suspension with an A_{600} reading of 1.0. The cylinder was statically incubated at 37°C for 4 h, after which the culture was poured into a prewarmed 2-liter flask to continue growth under orbital shaking (200 rpm) for an additional 6 h (AKI conditions). We defined non-AKI conditions as those where cultures were either kept without shaking (prolonged static growth) or shaken without a prior static growth period (continuous shaking). For the prolonged static growth condition, the culture was maintained in the cylinder; for continuous shaking, the 500-ml culture was orbitally shaken from the start in the 2-liter flask. From each of these cultures, 25- to 50-ml aliquots were removed every hour, poured over ice, and centrifuged for cell recovery. Collected bacteria were usually stored overnight at -20°C , and RNA extractions were carried out the following day. RNA was obtained from bacterial pellets by using TRIzol reagent (GIBCO-BRL) according to the manufacturer's instructions. At the end of the procedure, RNA concentrations were in all cases adjusted to 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ on the basis of A_{260} measurements. This compensated for differences in bacterial density among time points within a growth curve as well as for differences between cultures. RNA aliquots were additionally run in agarose gels to further check for RNA concentrations; these estimates were always consistent with A_{260} values. Primer extensions for *toxT* and *ctxA* transcripts were performed as described previously (15), using *toxT* primer 5'-CATTAGTTTGAAAAGATTTT TTTCCAATCAT-3', where the underlined triplet is complementary to the ATG codon for the first amino acid in ToxT. The *ctxA*-specific primer was 5'-GAATCTGCCGATATAAATTATCATCATTTCAT-3', where the underlined nucleotides are complementary to the codon for amino acid 8 in the mature CtxA protein sequence. For autoradiographic detection of primer extension products (15), denaturing acrylamide gels were run, loading 5 μl of the primer extension reaction mixture per well in all experiments.

RT-PCR. Evidence for the presence of a *toxT* mRNA was obtained by treating aliquots from the RNA samples with murine leukemia virus (MLV) reverse transcriptase (RT) followed by PCR with AmpliTaq polymerase, using a GenAmp RNA PCR kit (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. To control for the absence of contaminating template DNA in RNA samples, a PCR was run for each of the tested samples, using the same kit components but omitting the MLV RT. Lack of amplification in the absence of RT confirmed that the PCR products were generated from cDNAs. The upstream primer used for RT-PCR of *toxT* mRNA was 5'-CTTACGTTGGATCC CTCTCTGCG-3', where the underlined G hybridizes at position -31 with respect to the initiation codon ATG. The downstream primer was 5'-CTACCCA ACTGCAGTGATACAATC-3', where the underlined triplet is the complementary sequence to the *toxT* stop codon (TAG). For the control *ctxA* RT-PCR, the upstream primer was 5'-CGTTTGGATCCAGGGAGCATTATATGGTAAA G-3', where the underlined triplet corresponds to the start codon, and the downstream primer was 5'-GCGATAAGCTTCATAATTCATCTGAATTC-

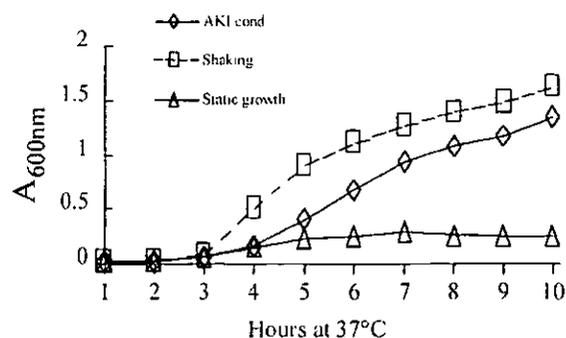


FIG. 1. Growth curves of *V. cholerae* El Tor E7946 under AKI and non-AKI conditions. Cultures were grown in AKI medium at 37°C under prolonged static growth (Static growth), continuous shaking (Shaking) or by the AKI method (AKI cond.).

3', where the underlined nucleotides correspond to the complementary stop codon sequence for *ctxA*.

Immunoblots. Detection of the ToxR protein throughout the AKI culture was done with bacterial cell pellets collected at the same time points as for RNA aliquots. Due to low bacterial concentrations at the early time points, the amount of sample needed for protein measurements and immunoblots required the processing of relatively large culture volumes. However, processing of culture volumes with low bacterial density provided insufficient material due to poor pelleting during centrifugation. For maximal sample saving, we opted to normalize aliquots by estimating bacterial concentrations through A_{600} . Volumes of bacterial pellets were adjusted according to A_{600} values, and aliquots were directly resuspended in electrophoresis sample buffer. Cell contents were released by boiling, and samples were loaded in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Separated proteins were electrotransferred to nitrocellulose, and immunoreactive protein bands were developed by standard techniques using anti-ToxR rabbit antiserum (kindly provided by J. Mekalanos, Harvard University), peroxidase-coupled anti-rabbit immunoglobulin G (Miles Laboratories), and chloronaphthol substrate. A commercial molecular weight marker (High Molecular Range Rainbow Marker; Amersham) was used to confirm the expected position for the ToxR immunoreactive band.

Immunodetection of TcpA. For TcpA detection, bacterial pellets obtained from 50-ml culture aliquots for h 3 and 4 and from 1.5-ml aliquots for subsequent hours were resuspended in 100 μl of phosphate-buffered saline. Resuspended cells were lysed by repeated freeze-thawing, and total protein contents were adjusted to the same value according to protein determinations using a commercial protein determination kit (Bio-Rad). Samples of 5 μl were directly placed on nitrocellulose paper, and TcpA was assayed in situ reaction with anti-TcpA monoclonal antibody (MAb) 20:2 (20), anti-mouse immunoglobulin G-peroxidase conjugate, and chloronaphthol substrate by standard techniques. Attempts to detect TcpA with MAb 20:2 by Western blotting were not successful due to poor reactivity with the El Tor TCP in this assay (20).

Detection of CT. Detection of CT was done on culture supernatants and in bacterial pellets. Bacterial pellets from 1 ml of culture were resuspended in 500 μl of PBS, and cell contents were released by three ultrasonication bursts on ice. Supernatants and sonicates were twofold serially diluted and assayed by GMI enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (30), using a MAb LT39 reactive with the B subunit of CT (31), using either CT (Sigma) or the B subunit of CT (27) at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as the standard.

RESULTS

Growth of *V. cholerae* El Tor under AKI and non-AKI conditions. Figure 1 presents the growth curves for strain E7946 under standard AKI conditions, prolonged static growth, and continuous shaking. As seen, the highest growth rate was achieved by continuous shaking. Culturing under AKI conditions also resulted in a high growth rate, but this was dependent on initiation of the shaking phase at h 5. The prolonged static growth culture reached A_{600} s of 0.148 at h 4 and 0.22 at h 5. From this time onward, increases in absorbance were minor, indicating that the early stationary phase had been reached. Based on the latter observation, and to avoid excessive incubation of this culture, a 10-h point to conclude the experiment was chosen. According to previous experiments,

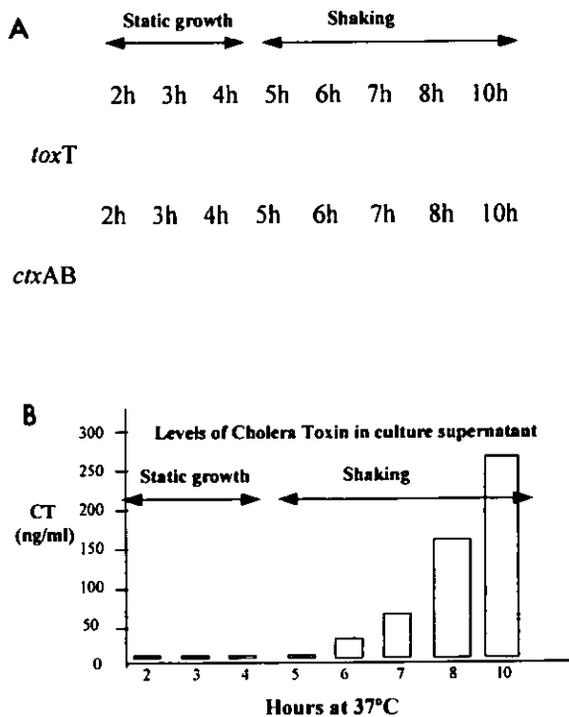


FIG. 2. (A) Primer extension products from *toxT* and *ctxAB*, and CT levels under AKI conditions. Incubation periods under static growth or shaking phases of an AKI growth are indicated with the double-headed arrows. A composite figure using relevant sections of autoradiographs was constructed to facilitate comparisons. The respective primer extension products are labeled at the left. (B) CT values from GM1 ELISA. Concentrations shown are expressed as equivalents of standard CT per culture supernatant volume unit. Levels of CT in cell pellets were less than 3 ng/ml in all cases.

this point in time was found to correspond to the early stationary phase for the cultures under the other two growth conditions. The 10-h incubation period seemed also physiologically adequate in terms of CT production because toxin concentrations at this time and after overnight growth were practically the same.

Expression of *toxT* and *ctxAB* in *V. cholerae* El Tor. RNA samples prepared from culture aliquots taken every hour were subjected to primer extension using *toxT*- and *ctxA*-specific primers. Figure 2 shows ToxR-dependent primer extension products and CT levels for h 2 to 8 and h 10. The *toxT* primer extension product was abundant at h 4 and 5 but was no longer detectable after this point. We observed induction of *ctxAB* transcription as soon as the culture was shifted to shaking (Fig. 2). Also, transfer to shaking quickly led to production of CT and its release into the culture supernatant (Fig. 2). CT concentrations paralleled the increase in intensity of the primer extension product from *ctxAB*. In contrast, and in agreement with experiments that defined AKI conditions (17), growth under continuous shaking resulted in practically undetectable levels of CT. This was reflected in undetectable levels of both *toxT* and *ctxAB* primer extension products (data not shown).

The results for *toxT* transcription under prolonged static growth were similar to those for AKI conditions, with the *toxT* primer extension product appearing at h 4 and disappearing after h 5, except for a comparably lower-intensity primer extension band at this last time (Fig. 3). Under prolonged static growth, there was a virtual absence of the *ctxAB* primer extension product, except for a very faint band at h 4 (Fig. 3). This

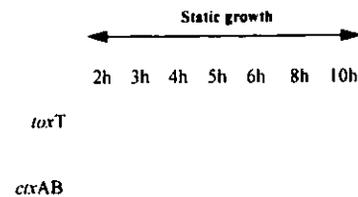


FIG. 3. Primer extension products from *toxT* and *ctxAB* under prolonged static growth. Relevant sections of autoradiographs were used to compose the figure and to facilitate comparisons. Samples obtained at different times during culture, as indicated above the lanes, were subjected to primer extension for *toxT* (upper panel) and *ctxAB* (lower panel). A barely visible primer extension band was found at h 4 for *ctxAB*.

faint band was also visible in the AKI culture (Fig. 2), suggesting a low basal activity of ToxT over *ctxAB* transcription before the start of the shaking culture phase.

Detection of the ToxR protein under AKI conditions. To assess ToxR levels through AKI growth, samples of total proteins obtained from time point aliquots throughout the AKI growth curve were analyzed on immunoblots probed with anti-ToxR antiserum (Fig. 4). As seen, the presence of ToxR in cells was detected from h 2 and until h 10. Although some minor variability in the intensity of immunoreactive bands was observed, the experiment demonstrates that ToxR was present during both the static growth and shaking culture phases. Of significance was the fact that ToxR was present during shaking and especially after h 6 (Fig. 4). This is particularly meaningful because in the 6- to 10-h interval the ToxR-dependent *toxT* primer extension product was undetectable (Fig. 2). This suggests that transient *toxT* transcription is not due to an effect of AKI conditions on *toxR* gene expression but rather depends on the ability of ToxR to activate the *toxT* gene.

RT-PCR detection of *toxT* transcripts. Experiments with classical strains of *V. cholerae* suggest that after transient ToxR-dependent *toxT* transcription, *toxT* transcripts are maintained in the cell, evidently as a result of ToxT-dependent transcription of a large, polycistronic mRNA initiating at the *tcpA* promoter (36). A similar model could account for the sustained *ctxAB* transcription during shaking that we observe in the absence of activated ToxR-dependent expression of *toxT* detectable by primer extension. To determine if this could be so, RNA aliquots from h 6 to 10 were subjected to RT-PCR. Figure 5 shows *toxT* RT-PCR products whose sizes were compatible with binding of primers at both ends of the *toxT* structural gene. This experiment demonstrates the presence of a *toxT* mRNA at times when *toxT* mRNA arising from de novo activation by ToxR is undetectable. Control reactions in the absence of MLV RT gave no amplification products, confirm-

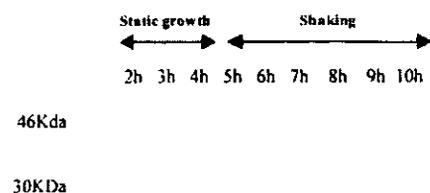


FIG. 4. Immunoblot detection of ToxR along the AKI growth curve. To compensate for differences in protein concentration between time points, bacterial cells were lysed by direct boiling in variable volumes of sodium dodecyl sulfate sample buffer (Materials and Methods). Times at which aliquots were removed from the AKI culture are indicated above the lanes. Positions for reference protein bands in a commercial molecular weight marker are shown on the left.

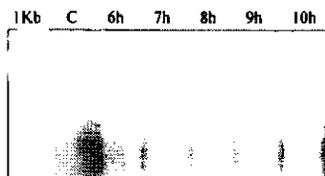


FIG. 5. Detection of a *toxT* transcript by RT-PCR during h 6 to 10 of an AKI culture. An ethidium bromide-stained agarose electrophoresis gel is presented. Samples: 1Kb, 1-kb molecular weight marker (Promega); C, example control RT-PCR from an RNA sample (5-h time point) in the absence of RT; 6h to 10h, RT-PCR of RNA samples from h 6 to 10 of an AKI culture (shaking phase). Note that except for the control RNA, all samples corresponded to times at which no ToxR-dependent *toxT* transcript was detected by primer extension (see Fig. 2).

ing the absence of contaminating DNA in samples. An example of a control reaction is shown in Fig. 5. Additional confirmation of successful mRNA detection was obtained by concurrent RT-PCRs with *ctxA* primers. Similar to results shown, *ctxA* amplification products were obtained at the same time points (not shown).

Immunodetection of TcpA. The *tcpA* promoter is required for optimal *toxT* expression and high CT levels in classical *V. cholerae*. This is because transcription initiating at this promoter results in a large polycistronic message that includes *toxT* at the 3' end (2, 36). As a measure of *tcpA* induction in our El Tor cultures under AKI conditions, and, by extension, a measure of *toxT* transcription from the *tcpA* promoter occurring after transient activation by ToxR, we followed expression of the TcpA protein by dot blotting using a MAb against TcpA (20). Hourly aliquots were obtained from h 3 to 10, and TcpA levels were determined by immunoblotting. Results in Fig. 6 show that TcpA was present at all sampled times, although initiation of the shaking culture phase strongly stimulated TcpA production (Fig. 6, 5 h). After this point in time, TcpA levels remained essentially constant (Fig. 6, 5 to 10 h). Since TcpA synthesis is strongly induced by the presence of ToxT in the cell (2), continued expression of TcpA during shaking would suggest sustained expression of *toxT*. However, *toxT* transcription from its ToxR-dependent promoter was no longer detectable by primer extension after h 6 (Fig. 2). These results could be reconciled if there were *toxT* transcription initiating from *tcpA* during the shaking culture phase in a manner similar to that described for classical strains under non-AKI conditions (36) (see Discussion).

DISCUSSION

The expression of CT under AKI conditions has been the subject of recent experiments aimed at explaining the role of the positive regulator ToxT in CT production by *V. cholerae* El Tor (10). Here we provide evidence for a delicately concerted regulation of ToxT by ToxR through a transient transcription of the *toxT* gene, not previously detected if AKI cultures were

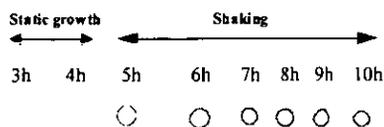


FIG. 6. Detection by dot blotting of TcpA in bacterial cell lysates from an AKI culture. Times at which aliquots were obtained are indicated above the dots. Incubation periods under static growth or shaking are indicated with the double-headed arrows.

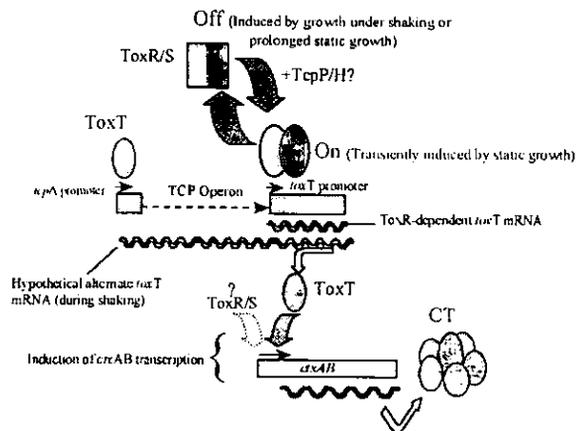


FIG. 7. Hypothetical model for the role of ToxR in the *V. cholerae* El Tor response to AKI conditions. Boxes represent genes, and arrows above them indicate promoters as well as direction of transcription. The discontinuous arrow represents genes located between *tcpA* and *toxT* in the TCP operon (2). Wavy lines symbolize mRNAs. Other arrows indicate transition between ToxR states or mRNA translation. The ToxT protein (filled oval) is shown above the *tcpA* and *ctxAB* promoters to indicate its role as a transcriptional inducer of both genes (2, 9). A diagrammatic representation of CT is included. The postulated on status of ToxR (ToxR/S), induced by static growth, is represented by dashed ovals; the postulated off status, induced by shift to shaking, or by prolonged static growth, is represented by dashed squares. A potential participation of TcpP/H (+TcpP/H?) in promoting the on status is indicated. Positive modulation by TcpP/H under AKI conditions would not disagree with previous reports on TcpP/H stimulation of ToxR-dependent *toxT* transcription (3, 13, 23, 33). A potential contribution to *ctxAB* expression by ToxR/S is indicated with a dashed arrow.

sampled at a later time (10). Transient transcription apparently takes place in response to the combination of static growth and culture cell density because induction occurred during the static period and at the early stationary phase. These results are in agreement with the initial physiological studies performed by Iwanaga et al., who showed that a 4-h static growth period followed by strong aeration was optimal to stimulate CT production in *V. cholerae* El Tor (17, 18). We found that ToxR-driven transcription of *toxT* was initiated precisely at the h 4 yet expression was transient, continuing for only 1 h during shaking. This result indicated that ToxR was unable to sustain its positive effect over *toxT* transcription. Irrespective of this, transfer of cultures to shaking stimulated transcription of *ctxAB*, along with the appearance of CT in the medium. Interestingly, when cultures were not shifted to shaking but instead continued under static growth, the *toxT* primer extension product also disappeared after h 5 (Fig. 3). This finding indicated that ToxR was unable to maintain positive regulation over *toxT* also when the static growth phase was prolonged. Thereby, positive regulation of *toxT* by ToxR seems to occur only within a narrow physiological window sensitive to either strong aeration or prolonged static growth. We propose that the ToxR response involves a change in its ability to activate the *toxT* promoter, as opposed to modulation of *toxR* gene expression, because immunoblot experiments showed the ToxR protein was produced throughout the AKI culture (Fig. 4). Especially meaningful was the fact that ToxR was present after h 5, times at which activation of *toxT* transcription by ToxR was no longer detectable by primer extension (Fig. 2). These results are in agreement with the previous report of ToxR expression in El Tor vibrios regardless of growth conditions (10). An on/off switch for ToxR (ToxR/S) activity would be a simple model to explain transcriptional control of *toxT* from the promoter directly upstream (Fig. 7). In this switch model, we propose that

at h 4 and 5, ToxR is in its on condition and that shaking or prolonged static growth beyond this point induces the ToxR off status (Fig. 7). Switching between on and off stages could be proposed to involve changes between ToxR-ToxR and/or ToxR-ToxS dimeric and monomeric molecular species (8, 24). However, induction or deactivation of ToxR may require the participation of other regulators since simple changes in amounts of dimeric versus monomeric forms do not account for ToxR responses to environmental stimuli in classical vibrios (24). Likely candidates that could affect ToxR control over *toxT* are TcpP and TcpH. Mutations in *tcpH* result in undetectable or reduced ToxR-dependent *toxT* transcription and CT synthesis in the classical *V. cholerae* strain O395 (3, 36), while TcpP stimulates *toxT* transcription in O395 (13). Furthermore, a positive synergistic effect on *toxT* transcription has been observed when both TcpP and TcpH are present in the cell (13). This has led to the hypothesis that TcpP and TcpH constitute a positive regulatory system functionally similar to the ToxR/S system (13). Analysis of *tcpP* mutants in O395 showed that ToxR-dependent *toxT* transcription normally requires the joint action of both TcpP and ToxR (21a, 36). In view of this, it is quite possible that the proposed on/off ToxR switch involves TcpP, perhaps through the formation of a complex consisting of TcpP/H and ToxR/S. Experiments are under way to test this hypothesis.

According to early work (7, 22), the sustained *ctxAB* transcription observed (Fig. 2), in spite of reduction or absence of the ToxR-dependent *toxT* transcription, could be explained by direct action of ToxR over *ctxAB*. However, recent studies point to major, and perhaps exclusive, activation of *ctxAB* by ToxT in *V. cholerae* (5, 10). Lack of an independent ToxR activity on *ctxAB* in our studies is supported by the fact that VJ739 (5), a ToxT⁻ ToxR⁺ mutant of El Tor strain E7946, was unable to produce CT when grown in parallel and under the same AKI conditions (data not shown). This implies the need to account for induction of *ctxAB* transcription through control of ToxT levels in the cell. Maintained ToxT concentrations could be due to low-level transcription from the same promoter that was undetectable; nonetheless, low-level transcription would seem insufficient to account for the strong *ctxAB* transcription observed (Fig. 2). The need of de novo synthesis to maintain ToxT levels in the cell appears likely. First, ToxT dilution due to mass increase during growth would imply an inverse relation between ToxT activity and protein concentration. Second, ToxT has proven highly labile in purification schemes applied to classical *V. cholerae* strains (7a), which may suggest that the protein is inherently unstable. An alternative to ToxR-dependent activation for sustaining ToxT production would be through the presence of *toxT* message by readthrough transcription from a different promoter.

A candidate promoter located 12.6 kb upstream of the *toxT* gene and in front of the *tcpA* gene, the first of 12 contiguous genes in the TCP operon, has been proposed to generate a long mRNA containing a transcript for ToxT in the classical strain O395 (2). Although a 12- to 13-kb-long message has not formally been shown, a *tcpA*-dependent message, containing both the upstream *tcpF* and *toxT* transcripts, has been demonstrated by RNase protection studies (2). Moreover, because *toxT* activates *tcpA*, a positive feedback effect has been proposed and theorized to represent a self-regulatory mechanism for ToxT (2). This is in full agreement with the recent observation that the *tcpA* promoter in O395 is required for maximal *toxT* transcription and CT production (36). That transcription from *tcpA* plays a role in AKI cultures is supported by the fact that TCP synthesis in El Tor vibrios is positively stimulated by those culture conditions (10, 21). In this report, we provide

evidence in support of *toxT* transcription from the *tcpA* promoter. We detected a transcript for the structural *toxT* gene by RT-PCR (Fig. 5) at times when ToxR-dependent *toxT* primer extension product was undetectable (h 6 to 10). Attempts to demonstrate that this transcript comes from the hypothetical polycistronic TCP mRNA by RT-PCRs using commercial enzymes specially designed to obtain products longer than 12 kb were not successful. This failure could be due to mRNA processing at internal positions within the TCP operon and/or to an unstable message (2). In view of this difficulty, and considering that in O395 *tcpA* expression has been found to closely correlate with transcription of the whole operon including *tcpI* the gene lying immediately downstream of *toxT* (2), we assayed for the presence of TcpA by dot blot experiments. We found synchronous induction of TcpA production (Fig. 6) coincident with *ctxAB* transcription throughout the shaking culture phase. This finding is in complete agreement with primer extension experiments showing that very little *tcpA* transcript is made before h 4, with an increase in level after this time point; thereafter the level is maintained throughout the rest of the culture (21b).

Because ToxT activates *tcpA* and we found increases in TcpA, it follows that high TcpA concentrations may be due to the presence of higher than basal ToxT levels in the cell. In the virtual absence of ToxR-dependent transcription (Fig. 2), higher ToxT levels could be explained by the same self-dependent readthrough transcription mechanism operating in classical strains (36).

This hypothesis is summarized in a model presented in Fig. 7. The model includes the above-discussed on/off switch mechanism for ToxR and proposes to account for the role of ToxR (ToxR/S) and ToxT in the response of *V. cholerae* El Tor to AKI conditions. We have incorporated in the model the above-discussed potential participation of the positive regulators TcpP and TcpH (13), indicating that they could enhance the effect of ToxR (ToxR/S) over the *toxT* promoter (Fig. 7). Completion of the model will require determining if the differences in activity between TcpP/H from classical and El Tor vibrios (4) is of relevance to this system. It will also be helpful to define if the cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein complex and TcpI, both of which are negative TCP operon regulators in classical strains (28, 29), contribute to the final steady-state levels of ToxT in El Tor vibrios. However, the proposal for TcpI as a negative *tcpA* regulator has been questioned (33). Finally, the reason for the requirement of a shaking culture phase to induce *ctxAB* transcription remains to be determined.

In terms of the biomedical relevance of results here presented, it is clear that the *V. cholerae* El Tor response to external stimuli seems exquisitely sensitive and most appropriately designed to express CT only when certain growth conditions are met. Such conditions appear to include the bacterial population status and suggest that *V. cholerae* senses its own cell density in the intestine (19), in analogy to quorum sensing by phylogenetically related bacteria (1). If this type of sensitively concerted expression of virulence genes reflects events during infection, El Tor vibrios can be assumed to produce CT not continuously but in bursts. The burst would occur at the point where bacterial multiplication and nutrient consumption inside the gut have led to conditions equivalent to those under an AKI growth. Production of CT with its fluid secretion activity would flush bacteria out of the intestine; remaining vibrios would reinstate the growth cycle. Newly multiplied bacteria would be flushed again when the same conditions are present. How this would be advantageous for vibrios is not clear, but if initial CT synthesis occurred at relatively low bacterial densities, as seen in vitro, total amounts of CT inside

the gut would also be relatively low by the time bacteria were expelled. This may result in a less aggressive infection, which in turn could help explain why El Tor vibrios cause a less severe disease, with a higher proportion of asymptomatic cases, than classical strains (12). A theoretical ecological advantage derived from a less severe disease is that if El Tor-infected individuals are less debilitated, they could more easily disseminate vibrios into the environment (6). A more efficient dissemination could explain why the El Tor biotype has quickly established itself throughout the world in the last decades. In the latter respect, it is noteworthy that the more recent, rapidly spreading *V. cholerae* O139 shares many characteristics with *V. cholerae* El Tor, including a requirement for growth under AKI conditions to produce CT (33).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. L. Puente and E. Morett for useful discussions, Rosa Yu for assistance with primer extension experiments and comments on the manuscript, and Patricia Romero for help with immunoblots.

J.S. gratefully acknowledges a stipend by Sistema Nacional de Investigadores (Mexico). A.I.M. was recipient of a scholarship for Ph.D. studies (CONACYT, Mexico). This work was supported by grant SPE-VACC-HN-01 (SAREC-SIDA, Sweden) (to J.S.) and Public Health Service grant AI 31645 (to V.J.D.) from the National Institutes of Health.

REFERENCES

- Bassler, B. L., E. P. Greenberg, and A. M. Stevens. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 179:4043-4045.
- Brown, R. C., and R. K. Taylor. 1995. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Mol. Microbiol.* 16:425-439.
- Carroll, P. A., K. T. Tashima, M. B. Rogers, V. J. DiRita, and S. B. Calderwood. 1997. Phase variation in *tcpH* modulates expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 25:1099-1111.
- Carroll, P. A., K. Skorupski, R. K. Taylor, and S. B. Calderwood. 1998. Differences in transcription and activity of the *tcpPH* gene products explains differential regulations of the ToxR regulon between classical and El Tor *Vibrio cholerae*, abstr. B-185, p. 86. In Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology 1998. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Champion, G. A., M. N. Neely, M. A. Brennan, and V. J. DiRita. 1997. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol. Microbiol.* 23:323-331.
- Crawford, J. A., and V. J. DiRita. Unpublished data.
- Ewald, P. W. 1991. Waterborne transmission and the evolution of virulence among gastrointestinal bacteria. *Epidemiol. Infect.* 106:83-119.
- DiRita, V. J. 1992. Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 6:451-458.
- DiRita, V. J. Unpublished data.
- DiRita, V. J., and J. J. Mekalanos. 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* 64:29-37.
- DiRita, V. J., C. Parsot, G. Jander, and J. J. Mekalanos. 1991. Regulatory cascade controls virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5403-5407.
- DiRita, V. J., M. Neely, R. K. Taylor, and P. M. Bruss. 1996. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7991-7995.
- Dubey, R. S., M. Lindblad, and J. Holmgren. 1990. Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. *J. Gen. Microbiol.* 136:1839-1847.
- Glass, R. I., S. Becker, I. M. Huq, B. J. Stoll, M. U. Khan, M. H. Merson, J. V. Lee, and R. E. Black. 1982. Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966-1980. *Am. J. Epidemiol.* 116:959-970.
- Häse, C. C., and J. J. Mekalanos. 1998. *TcpP* protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:730-734.
- Higgins, D. E., E. Nazareno, and V. J. DiRita. 1992. The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 174:6974-6980.
- Higgins, D. E., and V. J. DiRita. 1994. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 14:17-29.
- Higgins, D. E., and V. J. DiRita. 1996. Genetic analysis of the interaction between *Vibrio cholerae* transcription activator ToxR and *toxT* promoter DNA. *J. Bacteriol.* 178:1080-1087.
- Iwanaga, M., K. Yamamoto, N. Higa, Y. Ichinose, N. Nakasone, and M. Tanabe. 1986. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* 30:1075-1083.
- Iwanaga, M., and T. Kuyakanond. 1987. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *J. Clin. Microbiol.* 25:2314-2316.
- Jobling, M. G., and R. K. Holmes. 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Mol. Microbiol.* 26:1023-1034.
- Jonson, G., J. Holmgren, and A. M. Svennerholm. 1991. Epitope differences in toxin-coregulated pili produced by classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 11:179-188.
- Jonson, G., A. M. Svennerholm, and J. Holmgren. 1990. Expression of virulence factors by classical and El Tor *Vibrio cholerae* in vivo and in vitro. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74:221-228.
- Krukonis, E. S., and V. J. DiRita. Unpublished data.
- Miller, A., V. J. DiRita, and J. Sanchez. Unpublished data.
- Miller, V. L., R. K. Taylor, and J. J. Mekalanos. 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48:271-279.
- Ogierman, M. A., E. Voss, C. Meaney, R. Faast, S. R. Attridge, and P. A. Manning. 1996. Comparison of the promoter proximal regions of the toxin-coregulated *tcp* gene cluster in classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* 170:9-16.
- Otteman, K. M., and J. J. Mekalanos. 1996. The ToxR protein of *Vibrio cholerae* forms homodimers and heterodimers. *J. Bacteriol.* 178:156-162.
- Pearson, G. D., V. J. DiRita, M. B. Goldberg, S. A. Boyko, S. B. Calderwood, and J. J. Mekalanos. 1990. New attenuated derivatives of *Vibrio cholerae*. *Res. Microbiol.* 141:893-899.
- Peterson, K. M., and J. J. Mekalanos. 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* 56:2822-2829.
- Sanchez, J., and J. Holmgren. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:481-485.
- Skorupski, K., and R. K. Taylor. 1997. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin co-regulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:265-270.
- Skorupski, K., and R. K. Taylor. 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* 25:1003-1009.
- Svennerholm, A. M., and J. Holmgren. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1:19-23.
- Svennerholm, A. M., M. Wikström, L. Lindholm, and J. Holmgren. 1986. Monoclonal antibodies and immunodetection methods for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*, p. 77-95. In A. J. Macario et al. (ed.), *Monoclonal antibodies against bacteria*, vol. III. Academic Press, New York, N.Y.
- Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong, and J. J. Mekalanos. 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2833-2837.
- Thomas, S., S. G. Williams, and P. A. Manning. 1995. Regulation of *tcp* genes in classical and El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* 166:43-48.
- Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos. 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect. Immun.* 62:72-78.
- Waldor, M. K., and J. J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272:1910-1914.
- Yu, R. R., and V. J. DiRita. 1994. Analysis of an autoregulatory loop controlling ToxT, cholera toxin, and toxin-coregulated pilus production in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, in press.