

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL TRÁNSITO
INTRACELULAR DE LA TOXINA DE DISTENSIÓN CITOLETAL DE
Campylobacter jejuni.”

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTA

M. en C. Estela T. Méndez Olvera

COMITÉ TUTORAL:

CoDirectora: Dra. Yolanda López-Vidal
CoDirector: Dr. Jaime A. Bustos Martínez
Asesor: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Ciudad de México

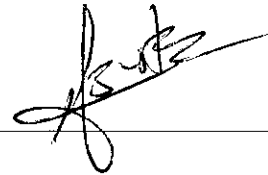
Junio 2017

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de
Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del
mismo Consejo, con el convenio **PPF-20-93**.

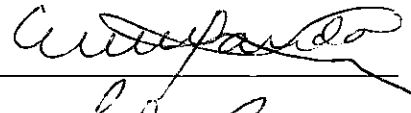
El jurado designado por las divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó la M. en C. Estela Teresita Méndez Olvera, el día 30 de junio del 2017.

Jurado:

Presidente: Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez



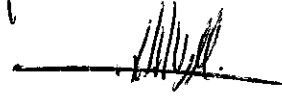
Secretaria: Dra. Yolanda López Vidal



Vocal: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez



Vocal: Dra. Delia Xochil Vega Manríquez



Vocal: Dra. Beatriz Arellano Reynoso



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada No.96960 para llevar a cabo los estudios de Doctorado en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco.

Agradezco al Programa “Acuerdos del Rector-2008”, de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, por el financiamiento otorgado.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo el proyecto doctoral.

Al Laboratorio de Biología Celular e Inmunología del Departamento de Atención a la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, por el uso del Citómetro de Flujo.

Para mis amores: Santiago Martínez Méndez y Daniel Martínez Gómez.

ÍNDICE.		Página
1.	Resumen.	1
2.	Abstract.	2
3.	Introducción.	3
3.1	Generalidades.	3
3.2	Ciclo celular.	6
3.3	Toxinas entéricas.	9
3.4	CDT (<i>Cytolethal Distending Toxin</i>).	11
3.5	Tránsito vesicular y citoesqueleto.	18
4.	Pregunta de investigación.	22
5.	Hipótesis.	22
6.	Objetivos.	22
6.1	General.	22
6.2	Específicos.	22
7.	Material y métodos.	23
7.1	Cepas bacterianas y medios de cultivo.	23
7.2	Extracción de ADN de <i>C. jejuni</i> .	23
7.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes <i>cdt</i> de <i>C. jejuni</i> .	24
7.4	Células Competentes para la transformación.	24
7.5	Clonación de los fragmentos amplificados de CDT.	24
7.6	Extracción de plásmido mediante lisis alcalina.	26
7.7	Selección de plásmidos en dirección correcta.	27
7.8	Purificación y secuenciación de plásmidos.	28
7.9	Inducción de la expresión de las proteínas CDT en <i>Escherichia coli</i> BL21pLysS.	28
7.10	Purificación de las proteínas CDT con columnas de Níquel.	28
7.11	Análisis de proteínas purificadas en SDS-PAGE.	29
7.12	Detección de las proteínas CDT por Western Blot.	29
7.13	Elaboración de anticuerpos policlonales específicos contra <i>Campylobacter jejuni</i> .	30
7.14	Absorción de Sueros.	30
7.15	Preparación de la toxina nativa de CDT.	31
7.16	Cultivo y Ensayo de citotoxicidad en células HeLa.	31
7.17	Ensayos de Fluorescencia.	32
7.18	Medición de la apoptosis por fragmentación del ADN.	32
7.19	Tratamiento con inhibidores del citoesqueleto.	33
7.20	Extracción de proteínas de células tratadas con la toxina CDT.	33

7.21	Inmunocuantificación de Cdc2-fosforilado.	33
7.22	Análisis del ciclo celular.	34
7.23	Análisis estadístico.	35
8. Resultados.		36
8.1	Detección y análisis de los genes <i>cdt</i> en <i>Campylobacter jejuni</i> .	36
8.2	Digestión de los productos de amplificación por PCR.	40
8.3	Clonación de los productos de PCR.	40
8.4	Inducción de la Expresión de la proteína recombinante.	47
8.5	Efecto de CDT en células HeLa.	50
8.6	Actividad de Cdc2 en células tratadas con CDT.	52
8.7	Efecto de Nocodazol y Latrunculina-A en la actividad citotóxica de CDT.	54
9. Discusión.		57
10. Conclusiones.		64
11. Perspectivas.		64
12. Bibliografía.		65
13. Anexos (tablas y artículo publicado).		70

1. RESUMEN

Campylobacter jejuni es el agente etiológico más común de diarreas infecciosas en todo el mundo. La enfermedad inducida por este microorganismo sugiere la producción de toxinas. La toxina de distensión citoletal (CDT) de *Campylobacter* spp interfiere con la progresión normal del ciclo celular. Este efecto tóxico se considera resultado de su actividad DNAsa, la cual produce alteraciones en el ADN de las células. Para lograr esta alteración, la toxina debe ser primero endocitada y translocada al núcleo. En este trabajo se evaluó la participación del citoesqueleto en la translocación de la toxina CDT al núcleo celular. Primeramente, se determinó por medio de la PCR, la presencia de los genes que codifican para la toxina CDT en siete aislamientos de *Campylobacter jejuni*, donados por el Instituto de Biotecnología-UNAM, y una cepa de referencia ATCC 33291. A partir de la cepa de referencia se recuperó la toxina nativa y se trató con ésta, cultivos de células HeLa con el fin de analizar los daños y cambios morfológicos inducidos por este tratamiento. Para evaluar el papel del citoesqueleto, los cultivos de células HeLa fueron tratados con latrunculina A y/o nocodazol, y se analizaron nuevamente los efectos de la toxina, a través de ensayos de microscopía, inmunofluorescencia, citometría de flujo y ELISA. Los resultados obtenidos mostraron que las ocho cepas de *C. jejuni*, incluyendo la cepa de referencia, tenían la capacidad de producir la toxina. Esto sugiere que la toxina CDT puede ser un elemento importante para la patogénesis de la campilobacteriosis; ya que todos los aislamientos clínicos mostraron la presencia de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. El tratamiento con los dos inhibidores del citoesqueleto, latrunculina A y nocodazol, evitó el efecto tóxico en las células tratadas con la toxina nativa. Este fenómeno fue evidente en el análisis de citometría de flujo y la cuantificación de Cdc2-fosforilado por medio de ELISA. Estos resultados sugieren que la actividad citotóxica de la toxina CDT de *C. jejuni* es dependiente de la integridad del citoesqueleto. La alteración en los microtúbulos y filamentos de actina provocaron un bloqueo del tránsito de la toxina, impidiendo que alcanzara el núcleo de la célula, evitando con ello la fragmentación del ADN y la alteración del ciclo celular.

2. ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the most common etiologic agent of infectious diarrhea worldwide. The disease induced by this microorganism suggests the production of toxins. *Campylobacter* spp cytolethal distending toxin (CDT) interferes with normal cell cycle progression. This toxic effect is considered a result of its DNase activity, which causes alterations in the DNA of the cells. To achieve this alteration, the toxin must first be endocytosed and translocated to the nucleus. In this work the participation of the cytoskeleton in the translocation of the CDT toxin to the cell nucleus was evaluated. Firstly, the presence of the CDT-encoding genes in seven *Campylobacter jejuni* isolates, donated by the Instituto de Biotecnología-UNAM, and a reference strain ATCC 33291 were determined by PCR. From the reference strain, the native toxin was recovered and HeLa cell cultures were treated with it, in order to analyze the damage and morphological changes induced by this treatment. To evaluate the role of the cytoskeleton, cultures of HeLa cells were treated with latrunculin A and / or nocodazole, and toxin effects were further analyzed through microscopy, immunofluorescence, flow cytometry and ELISA assays. The results showed that the eight strains of *C. jejuni*, including the reference strain, had the ability to produce the toxin. This suggests that CDT toxin may be an important element for the pathogenesis of campylobacteriosis, since all clinical isolates showed the presence of the *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes. Treatment with the two cytoskeletal inhibitors, latrunculin A and nocodazole, prevented the toxic effect in cells treated with the native toxin. This phenomenon was evident in the analysis of flow cytometry and the quantification of Cdc2-phosphorylated by ELISA. These results suggest that the cytotoxic activity of *C. jejuni* CDT toxin is dependent on cytoskeletal integrity. The alteration in the microtubules and filaments of actin caused a blockade of the transit of the toxin, preventing it from reaching the nucleus of the cell, thus avoiding DNA fragmentation and alteration of the cell cycle.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 Generalidades.

La palabra "toxina" fue empleada por primera vez por Roux y Yersin, quienes definieron a las toxinas, como sustancias venenosas que se producen por células vivas o microorganismos y que son capaces de causar enfermedad cuando se inoculan a individuos susceptibles ⁽¹⁾. En la última década se ha tenido un notable progreso en la comprensión de las interacciones de los microorganismos patógenos con sus hospedadores. Este avance ha dejado claro que los microorganismos patógenos han evolucionado desarrollado una variedad de estrategias para manipular las funciones de la célula hospedadora en su propio beneficio. Los mecanismos por los cuales los patógenos interfieren con los procesos celulares del hospedador a menudo implican la secreción o liberación de toxinas ^(1,2).

Tradicionalmente, las toxinas bacterianas se han definido como sustancias solubles secretadas por microorganismos patógenos que alteran el metabolismo normal de las células, con efectos adversos para el individuo. Actualmente el término "toxina" se utiliza tanto para estas sustancias solubles descritas por muchos investigadores, como para aquellas proteínas efectoras secretadas por los sistemas de secreción bacteriana, las cuales tienen funciones diversas ⁽²⁾.

A pesar de tener una amplia diversidad, en cuanto a estructura y modo de acción, las toxinas proteicas bacterianas pueden clasificarse en grupos funcionales ⁽³⁾. Estos grupos son:

1. Toxinas que actúan directamente sobre los receptores de la membrana plasmática de la célula hospedadora. Estas toxinas al actuar como agonistas o antagonistas de receptores en el hospedador corrompen las

vías de transducción de señales. Un ejemplo son los superantígenos producidos por *Staphylococcus aureus*, los cuales pueden unirse específicamente con el Complejo de Principal de Histocompatibilidad Clase II en la superficie de las células presentadoras de antígeno y con el receptor de células T, dando lugar a una activación no clonal de células inmunitarias y una hipersecreción de citocinas inflamatorias ^(1,3).

2. Toxinas que alteran la integridad de la bicapa lipídica de la membrana mediante su actividad como fosfolipasas o formando poros de diferentes tamaños. La pérdida de integridad de la membrana plasmática ocasionada por estas toxinas puede interferir con la señalización celular. Un ejemplo lo constituye la listeriolisina O (LLO) formadora de poros, producida por bacterias internalizadas en compartimentos fagocíticos. Con esta toxina *Listeria monocytogenes* rompe la membrana fagosomal, liberándose hacia el citosol para su diseminación ^(1,3).
3. Toxinas que introducen componentes enzimáticos tóxicos en células hospedadoras distantes a través de procesos de endocitosis mediada por receptores. Estas sofisticadas toxinas pueden describirse funcionalmente como acarreadores moleculares de la virulencia. Se denominan también toxinas “A-B”, debido a la presencia de un dominio A polipeptídico que posee actividad enzimática y uno o más dominios B, que se unen y regulan el ingreso de la subunidad A en la célula diana. Estas toxinas, tales como la toxina del Tétanos (TeNT), las neurotoxinas Botulínicas (BoNTs) y la toxina del cólera (CT) por mencionar algunas, están frecuentemente dotadas de una función virulenta importante, como ya se mencionó, y por lo tanto son de gran interés en el estudio de los mecanismos de virulencia bacteriana. Representan también valiosas herramientas para estudiar los procesos biológicos de las células, como: 1) endocitosis de receptores y tránsito vesicular, tal es el caso del transporte retrógrado de la toxina Shiga (Stx) desde la superficie de la célula hasta el retículo endoplásmico

(ER); (2) translocación de su dominio enzimático a través de membranas intracelulares; y 3) la regulación y función de sus blancos intracelulares, tal es el caso de las proteínas G y la toxina del cólera. En los últimos años ha surgido un gran interés por utilizar estos factores de virulencia, como herramientas médicas, por ejemplo, para eliminar células cancerígenas o para inducir respuestas inmunitarias ⁽⁴⁾.

4. Toxinas que se sintetizan dentro de la bacteria y se administran directamente en la célula diana mediante una “aguja de inyección”, como las toxinas translocadas por el sistema de secreción tipo III de bacterias Gram-negativas o las secretadas por el sistema tipo IV. Las toxinas translocadas por estos sistemas (también llamadas efectores), poseen a menudo una actividad catalítica que modifica una proteína del hospedador a través de una modificación postraducciona (PTM), o a través de una interacción no covalente. Estas toxinas son translocadas por las bacterias patógenas en gran cantidad durante períodos cortos de tiempo para modificar la fisiología de la célula hospedera de manera transitoria. Un ejemplo es la toxina SopE de *Salmonella* spp, la cual es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, que estimula la actividad GTPasa de una proteína de la familia de Rac, para facilitar la entrada del microorganismo en las células epiteliales por medio de vacuolas ⁽⁵⁾.

Otro grupo particular de toxinas proteicas bacterianas, poseen la capacidad de modificar el ciclo celular de la célula hospedadora, como mecanismo de patogenicidad. De hecho, se han descrito varios géneros bacterianos con la capacidad de producir toxinas que interfieren activamente con el ciclo celular ⁽⁶⁾. Evidencia reciente demuestra que la alteración del ciclo celular en el hospedero por medio de toxinas, es uno de los mecanismos más explotados por distintos patógenos. Considerando su capacidad para alterar la progresión del ciclo celular, a estas toxinas se les ha dado el nombre de ciclomodulinas. Las ciclomodulinas representan un grupo heterogéneo de factores de virulencia

microbiana, la mayoría de ellas son de naturaleza proteica y tienen diferentes actividades enzimáticas como mecanismo de acción, tales como: transferasas, desaminasas, proteasas, glicosidasas, fosfatasas o DNAsas. Entre las ciclomodulinas, existen también toxinas del tipo AB, que interactúan con receptores en la membrana celular, utilizando uno o varios dominios de unión del componente B y distintas actividades enzimáticas del componente A. Hasta la fecha, no existe una clasificación precisa de las ciclomodulinas bacterianas, y solo se agrupan considerando su actividad enzimática ⁽⁷⁾.

3.2 Ciclo celular.

El ciclo celular eucariótico o programa de crecimiento y división celular (proliferación) consta de cuatro fases (figura 1), las cuales son:

- a) Fase "Gap 1" (G1). Es el intervalo entre la mitosis y la replicación del ADN, que se caracteriza porque en él, las células crecen y se diferencian. La transición que ocurre en el punto de control G1 hacia la siguiente fase (fase S), compromete a la célula a un ciclo proliferativo. Si las condiciones requeridas para esta transición no están presentes, entonces la célula entra en fase "G0", una fase no proliferativa. Las células en G0, pueden reanudar su ciclo con ayuda de señales externas, como la estimulación con factores de crecimiento.
- b) Fase de Replicación del ADN o fase de síntesis (fase S). Es el intervalo entre la fase G1 y la fase G2. En esta fase ocurre la replicación del material nuclear.
- c) Fase "Gap 2" (G2). Es el intervalo entre la fase S y la mitosis celular, en esta fase ocurren los preparativos para la división celular.
- d) Mitosis (fase M). En esta fase ocurre la separación del material genético duplicado y el contenido de la célula, para dar origen a dos células.

La regulación del ciclo celular es de gran importancia para los organismos unicelulares y multicelulares. Para coordinar la replicación y segregación del material genético durante este ciclo, las células eucarióticas han desarrollado mecanismos mediante los cuales aseguran que a través de las distintas fases del ciclo, se produzcan dos células con cantidades iguales de material genético (cromosomas) y de un tamaño adecuado. Estos mecanismos de control se han llamado puntos de control o “check points”. La progresión a través del ciclo celular eucariótico es impulsada por CDKs (*cyclin-dependent protein kinase*), que forman complejos binarios con diferentes ciclinas. Los cambios en la actividad de estos complejos dependen de las oscilaciones en los niveles de las ciclinas, cuya síntesis y degradación están reguladas por diversas vías a lo largo del ciclo celular. El control de la expresión y la localización subcelular de las subunidades centrales de la maquinaria de las CDKs, constituye el nivel primario de regulación del ciclo celular ^(8,9,10).

La actividad de las CDKs se regula mediante inhibidores específicos (CKIs) y por cambios en la fosforilación de la subunidad catalítica, en respuesta a señales tales como la disponibilidad de nutrientes, el tamaño de las células y la activación de los mecanismos de proliferación celular. La integración de todas estas señales, asegura una progresión ordenada a través del ciclo celular ⁽⁹⁾.

El comienzo de la mitosis en las células eucariotas está regulado por una CDK de 34 kDa de peso, llamada Cdc2, cuya actividad a su vez está regulada a lo largo del ciclo celular. La activación completa de Cdc2 es mecánicamente bastante compleja. Un paso inicial implica una asociación estable de Cdc2 con la ciclina B, si bien esta asociación es necesaria para su activación, no es suficiente. Se requieren múltiples modificaciones postraduccionales para la activación completa del complejo Cdc2/ciclina B. Estas modificaciones incluyen una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones, que están mediadas, en parte por las proteínas Wee1 y Cdc25. En células eucariontas, Cdc2 se fosforila en un residuo de Tirosina (Tyr-15), lo que induce una inhibición del complejo. La

desfosforilación de Cdc2 en Tyr-15 es un paso clave en la activación de Cdc2 y entrada de células en mitosis. La proteína Wee1, es un regulador negativo del ciclo celular con actividad quinasa, que fosforila a Cdc2 en Tyr-15. Cdc25 es un regulador positivo del ciclo celular con actividad de fosfatasa sobre Cdc2 en Tyr-15. Juntas, las proteínas Wee1 y Cdc25 determinan el momento de entrada en la mitosis en la célula ^(8,9).

En eucariotas superiores, Cdc2 está fosforilado también en Thr-14 además de Tyr-15. La desfosforilación de ambos residuos se produce en la transición de la fase G2 a M, con un aumento concomitante en la actividad de cinasa de Cdc2. Debido a la localización de Tyr-15 y Thr-14 dentro de un dominio de unión a ATP de Cdc2, se ha propuesto que la fosforilación de uno o ambos sitios, inhibe la actividad de cinasa de Cdc2, interfiriendo con la unión de nucleótidos ⁽⁸⁾.

Las ciclinas se identificaron inicialmente en ovocitos y huevos de invertebrados marinos, y se definieron como proteínas que variaban en abundancia durante el ciclo celular. Cada una de ellas contiene secuencias características denominadas "caja de ciclina". Con base en las similitudes de estas secuencias, las ciclinas se han agrupado en tres clases: ciclinas A, ciclinas B y ciclinas CLN. El complejo ciclina B/cinasa se activa justo antes de la mitosis, mientras que por el contrario las ciclinas A, se unen y activan a Cdc2 más temprano en el ciclo celular, en la fase S y G2. El complejo ciclina B/Cdc2 se ha denominado "factor promotor de la maduración" (MPF) y se activa al final de la fase G2, conduciendo a las células hacia la mitosis. La regulación de la actividad de Cdc2 no implica oscilaciones en los niveles de proteína, ya que su cantidad total parece ser constante durante las diversas fases del ciclo celular. La regulación de Cdc2 está dada por cambios en su estado de fosforilación durante el ciclo celular, como ya se ha mencionado ^(8,10).

En células de mamífero, levaduras y oocitos de *Xenopus*, la desfosforilación de un residuo de tirosina en Cdc2 es paralela a su activación, como ya se ha

mencionado. Esta fosforilación de un residuo de tirosina en Cdc2 previene la activación prematura de la mitosis en el ciclo celular, antes de que la replicación del ADN se haya completado^(9,10).

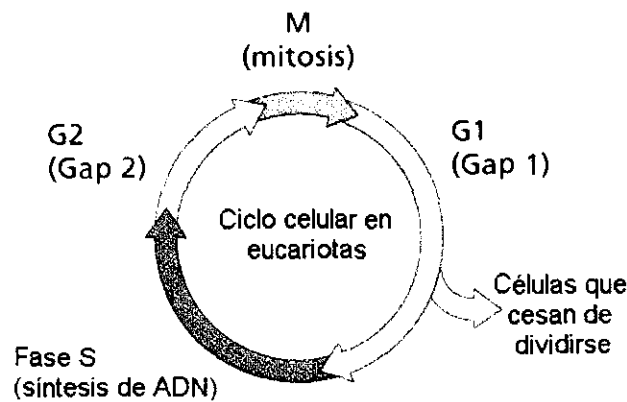


Figura1. Esquema de las fases que componen el ciclo celular.

Muchos patógenos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Helicobacter spp.*, *Salmonella Typhi*, *H. ducreyi* y *Campylobacter spp.*, producen toxinas capaces de detener el ciclo celular, con alteraciones subsiguientes, como distensión en células epiteliales y apoptosis en linfocitos. Los mecanismos de acción de varias de estas toxinas involucra la activación/desactivación de CDKs ^(11,12).

3.3 Toxinas entéricas.

La diarrea infecciosa, particularmente la debida a enterobacterias patógenas, es un problema de salud importante en todo el mundo. Las bacterias que colonizan el intestino, invaden células del epitelio intestinal pueden producir una o más toxinas que alteran la fisiología normal del intestino. No existe una clasificación estricta de las toxinas bacterianas entéricas, esto se debe en muchos casos, a que los datos disponibles de las toxinas aún están incompletos, debido a la complejidad de los mecanismos de acción de las toxinas ⁽¹³⁾.

Los mecanismos de acción establecidos para las toxinas entéricas suelen clasificarse en tres grupos generales: 1) toxinas con actividad enzimática intrínseca (toxinas tipo A-B); 2) toxinas que se unen a un receptor que estimula la liberación o la producción de un segundo mensajero, por ejemplo, calcio y AMPc; y 3) toxinas que se insertan directamente en la membrana celular, creando un poro permeable a los iones ^(1,13).

Entre los mecanismos de acción establecidos, el mejor entendido a nivel molecular son las toxinas con actividad de ADP ribosiltransferasa de algunas cepas de *E. coli* y *Vibrio cholerae*. No obstante existen otros patógenos capaces de producir diarrea y cuyos mecanismos de acción aún no están del todo establecidos^(10,12).

La enfermedad diarreica producida por *Campylobacter jejuni*, la cual comúnmente incluye diarrea acuosa transitoria que progresa a diarrea sanguinolenta, es coincidente con patologías con producción de toxinas. Diversas investigaciones han sido dirigidas hacia la búsqueda de toxinas producidas por microorganismos del género *Campylobacter* sp., la mayor parte de estas investigaciones han reportado actividades enterotóxicas o actividades citotóxicas que afectan a varias líneas celulares. Desafortunadamente, no obstante todos los estudios desarrollados a la fecha, nuestro conocimiento acerca de la producción y actividades de las toxinas de microorganismos del género *Campylobacter*, es todavía reducido ⁽¹⁴⁾.

En países desarrollados, así como en países en vías de desarrollo, diversas especies de *Campylobacter* spp se encuentran como contaminantes de alimentos destinados para el consumo humano. Estos microorganismos son reconocidos como los agentes más comúnmente involucrados en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales en el mundo. La epidemiología de las infecciones por *Campylobacter* spp en países desarrollados, difiere marcadamente con la de los países en vías de desarrollo por diferencias en el

clima, densidad de población, condiciones étnicas y necesariamente aspectos de sistemas de salud. Algunas diferencias epidemiológicas entre países desarrollados y en vías de desarrollo se pueden explicar por la exposición a temprana edad a dosis infectantes altas, las cuales a su vez inducen altos niveles de inmunidad en los primeros años de vida. Esta situación es similar al desarrollo de inmunidad parcial a la malaria en la infancia en áreas endémicas, donde las infecciones repetidas pueden resultar en una enfermedad con signos ligeros o un estado de portador crónico asintomático con periodos de reinfección ⁽¹⁴⁾.

3.4 CDT (*Cytolethal Distending Toxin*).

La toxina de distensión citoletal (CDT) fue reconocida por primera vez en 1987, cuando fue asociada a la cepa O55:K59:H4 de *Escherichia coli* aislada de un caso pediátrico de gastroenteritis con encefalopatía. Después de su identificación en *E. coli*, la producción de CDT fue observada también en varias especies de *C. jejuni*. El nombre de "Cytoletal Distending Toxin" fue acuñado por Johnson and Lior para reflejar el efecto progresivo de distensión celular con la eventual muerte, que se producía en distintas líneas celulares tratadas con este nuevo factor de virulencia encontrado en *C. jejuni* ⁽¹⁵⁾. A la fecha la toxina CDT se ha encontrado en otros microorganismos patógenos como *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter hepaticus*, *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, etc ^(16,17).

La toxina CDT de *C. jejuni* ha sido detectada en los sobrenadantes de cultivos bacterianos y afecta a células HeLa, CHO (Chinese ovary Hamster), Hep2 y VERO distendiéndolas en un periodo de 3 ó 4 días para finalmente ocasionar su muerte. La actividad parece ser efectiva en cultivos celulares jóvenes con células separadas con confluencias del 60%, mientras que en monoestratos con confluencia del 100% no se reporta distensión celular o muerte ^(16,18).

Esta toxina es termolábil y sensible a proteasas, no dializable y es producida en forma continua en cepas con un gran número de subcultivos *in vitro*. La habilidad de la toxina CDT para producir un aumento en los niveles de AMP cíclico (cAMP) ha sido evaluada, encontrándose que no es una característica distintiva de esta toxina. Además esta toxina, tampoco mostró efectos en ensayos de asas intestinales ligadas de conejo, por lo que no parece ser la responsable directa de la diarrea, aunque en ensayos de asas ligadas de rata, sí produjo la salida de líquido a la luz intestinal, característica común de las enfermedades diarreicas (16).

Johnson y colaboradores han estudiado más de 700 cepas de *Campylobacter*, incluyendo 583 de *C. jejuni*, 109 de *C. coli*, 16 de *C. lari* y 7 de *C. fetus*, encontrando actividad de CDT en aproximadamente el 40% de cada especie, sin correlación entre la producción de CDT con el serotipo o biotipo, tampoco con el país de origen. En otros trabajos, este mismo autor reportó actividad de CDT en un pequeño número de aislamientos de *E. coli*, *Haemophilus ducreyi* y *Shigella* spp (15).

En 1996 Pickett y colaboradores reportaron el aislamiento y la caracterización de los genes *cdt* de *C. jejuni* cepa 81-176. Estos genes fueron identificados y aislados a través del uso de iniciadores degenerados diseñados a partir de secuencias conservadas de los genes *cdt* de dos cepas de *E. coli*. Actualmente, los genes que codifican a cada una de las subunidades de la toxina CDT han sido clonados y secuenciados en varias especies incluyendo *C. jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemmitans*, ciertos aislados de *E. coli* y *Shigella dysenteriae*. Además con la publicación del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhi se ha demostrado la presencia de un gene *cdtB*, el cual codifica para una de las subunidades de la toxina CDT(19).

La toxina CDT de *C. jejuni* está codificada en tres genes adyacentes nombrados *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Las proteínas que componen a la toxina CDT de *C. jejuni* son

similares a las que componen a la toxina CDT de *E. coli*, sin embargo tienen también secuencias altamente divergentes. La más altamente conservada de las subunidades de la toxina CDT, es CdtB. Entre *E. coli* y *C. jejuni* la secuencia tiene aproximadamente un 60% de similitud en aminoácidos. Las tres subunidades tienen una secuencia líder típica de proteínas secretadas y CdtA parece tener una secuencia consenso de sitios de corte para lipoproteínas. El peso de cada una de las subunidades de la toxina CDT es 30.1 kDa para CdtA, 29.0 kDa para CdtB y 21.1 kDa para CdtC ^(16,20).

En *Campylobacter jejuni*, el primer marco abierto de lectura hacia arriba de la secuencia del gene *cdtA* está orientando en posición opuesta y su producto no muestra homología con ninguna de las proteínas conocidas. Inmediatamente después de este gene se encuentra en la misma dirección un gene que codifica para la subunidad I del citocromo D oxidasa, el cual comienza justo después de una secuencia putativa de terminación rho independiente. El marco abierto siguiente al gene *cdtC* hacia abajo está a 180 pb y codifica a una permeasa de L-lactato. Estos datos sobre la ubicación de los genes *cdt* indican que probablemente existen como un operón. Aún no se ha descrito si estos genes son expresados constitutivamente o si existen condiciones que regulen su expresión, sin embargo se sabe que en condiciones bajas o limitantes de hierro, distintas fases de crecimiento y diferentes temperaturas, no se modifica la expresión de estos genes⁽²⁰⁾. Byeonghwa y colaboradores han reportado que la transcripción de estos genes forman un RNA policistrónico, lo cual confirma la hipótesis de que estos genes forman un operón, además estos investigadores describieron un posible sitio de inicio de la transcripción a 81 pb del gene *cdtA*. En sus experimentos estos investigadores, demostraron la participación del gene *luxS*, ya que cepas mutantes en este gene, pierden la capacidad de expresar altos niveles de esta toxina, lo cual relaciona la producción de la toxina con eventos de “*Quorum Sensing*” ⁽²¹⁾.

Los genes *cdt* de *C. jejuni* pueden ser expresados en *E. coli*, aparentemente bajo su propio promotor, aunque esto no ha sido formalmente probado. La expresión de estos genes en *E. coli* es, sin embargo no tan eficiente como en *C. jejuni*, ya que cepas de *E. coli*, con varias copias de estos genes no muestran una gran actividad citotóxica, en comparación con cepas de *C. jejuni* con una sola copia en su cromosoma ⁽²²⁾.

El estudio de las regiones que flanquean los genes *cdt* de *C. jejuni* cepas 81-176 y NTC 11168, indican que al menos en esas dos cepas los genes *cdt* se encuentran en sitios idénticos, igualmente no se encontraron secuencias de inserción, fagos o plásmidos que pudieran sugerir que estas toxinas fueron adquiridas por transferencia horizontal. Este dato, junto con el hecho de que casi todas las cepas de *C. jejuni* poseen genes *cdt*, sugiere que estos genes han evolucionado junto con la especie ⁽¹⁴⁾.

En un trabajo, Lara-Tejero y colaboradores han presentado evidencia bioquímica de la necesidad de las tres subunidades para la actividad de la toxina ⁽¹²⁾, logrando establecer que cada subunidad tiene una relación 1:1:1 en la toxina completa, cualquier combinación distinta a esta relación resultó en una toxina inactiva. Este dato está en oposición con lo reportado por Lee y colaboradores, quienes de forma similar purificaron cada una de las subunidades de la toxina CDT y las mezclaron para formar la toxina activa, en su estudio reportaron que la combinación de CdtB y CdtC mostró una actividad del 80% en comparación con la toxina compuesta de las tres subunidades. En este mismo trabajo se cortaron regiones en las subunidades CdtA y CdtC, las cuales al ser combinadas con subunidades normales no mostraron actividad citotóxica, así mismo, cuando se mezclaron CdtA recortada y CdtB y CdtC normales no se observó efecto citotóxico, contrario a cuando solo se mezclaron solo CdtB y CdtC, lo que sugiere que la adición de la subunidad recortada bloquea la unión entre B y C. Por otra parte se evaluó de forma individual las subunidades A y C, y se mostró que ambas reconocen los mismos receptores ⁽²³⁾.

Si bien no existen estudios de cristalografía con la toxina CDT de *Campylobacter spp.*, si existen de la toxina CDT de *H. ducreyi* (Figura 2). La estructura cristalográfica de esta holotoxina muestra que CDT es un complejo cuaternario con tres interfases extensivas entre proteínas globulares, dándole a la toxina una superficie total de 6,300 Å². En este modelo, CdtA y CdtC mostraron una secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que se proyectan como polipéptidos no globulares, los cuales interactúan entre sí y con la subunidad B, por lo tanto contribuyen a la formación de un área interdependiente de interacción entre las subunidades de la toxina. CdtA y CdtC poseen ambas, estructuras tipo lectinas, homólogas a la cadena B de la toxina vegetal ricina consistente de 12 hojas Beta organizadas en tres hojas separadas. CdtA y CdtC juntas contribuyen a la formación de dos elementos de superficie notables, ambos localizados en la superficie de la holotoxina que está en oposición a CdtB. El primero de estos elementos es una región amplia compuesta de aminoácidos aromáticos, el segundo elemento es un surco de aproximadamente 20 x 10 Å de largo y 5-8 Å de profundidad. Mutaciones en la región de aminoácidos aromáticos dan como resultado la formación de una toxina inactiva en ensayos celulares, aunque la estructura se conserva. Esta característica está en concordancia con lo reportado por Lee y colaboradores para el caso de *Campylobacter*, ya que la estructura y la mutación de esta región en *H. ducreyi* apoya la idea de que la subunidad A, a través de la región de aminoácidos aromáticos tiene la función de unirse a la superficie de la célula. Además, en el caso de *H. ducreyi* la formación de la ranura por las subunidades A y C mimetiza un sitio de unión de péptidos (peptide binding cleft), el cual podría estar involucrado en el reconocimiento del receptor de esta toxina. La estructura de la toxina CDT de *H. ducreyi* también tiene cierta similitud con la cadena B de la toxina vegetal ricina ^(16,24).

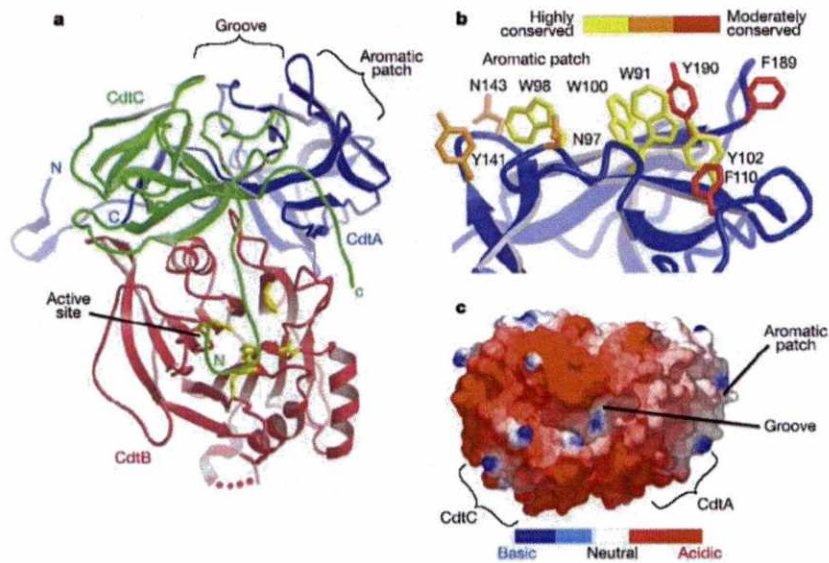


Figura 2. Estructura de la toxina CDT de *A. actinomycetemcomitans*⁽²⁴⁾.

Las similitudes en la actividad de cada una de las subunidades de las distintas toxinas CDT que han sido estudiadas, hacen sugerir que estas toxinas sean consideradas como toxinas AB, como la toxina del cólera (ctx) de *V. cholera*. En esta toxina la subunidad B reconoce al receptor en la superficie de la célula el cual consiste en el gangliósido GM1. Para el caso de otras toxinas AB el receptor cambia, por ejemplo en el caso de la toxina STx de *Shigella* el receptor consiste en una globotriacilceramida (GB₃/CD77). Para el caso de la cadena B de la toxina vegetal ricina, la cual guarda una gran similitud con la subunidad A de la toxina de CDT de *C. jejuni*, de acuerdo con la predicción de estructura secundaria realizada por nuestro grupo mediante el programa 3D PSSM, el receptor es un B1-4 galactósido, lo cual sugiere que este compuesto podría también estar involucrado en la unión de la toxina CDT de *C. jejuni*. Un gran número de proteínas y lípidos en la superficie celular muestran este tipo de galactósidos, lo cual explicaría la amplia capacidad, de la toxina CDT de *C. jejuni*, para unirse a distintas líneas celulares ⁽¹⁶⁾.

La subunidad B de la toxina CDT de *H. ducreyi* y *C. jejuni* muestra homología con DNAsas tipo I ⁽¹²⁾. En el caso de *C. jejuni*, Lara-Tejero y colaboradores ⁽²³⁾ mostraron que esta actividad es suficiente para explicar los efectos citotóxicos producidos por esta toxina, cuando inyectaron en el citoplasma de células Henle 407 la subunidad B y observaron los efectos tóxicos. Con estos experimentos también se observó que la subunidad B sola, es capaz de dirigir su tránsito hacia el núcleo o dado su tamaño, ser capaz de difundir a través de los poros nucleares. Sin embargo, en el caso de la toxina CDT de *C. jejuni* varias preguntas existen por resolver, la primera de ella es cómo esta toxina es translocada fuera del retículo endoplásmico, para otras toxinas, como la toxina Stx de *Shigella*, existe un mecanismo relacionado con las secuencias KDEL, la cual guía su transposición a través del sistema ERD2⁽¹⁶⁾. En el caso *C. jejuni* la subunidad B carece de esta secuencia por lo que debe de emplear otro sistema para salir del retículo endoplásmico, también carece del dominio KKXX relacionado con proteínas que serán translocadas hacia el citoplasma para su ubiquitinación y posterior degradación en algunos casos. Nuevamente, en el caso de la toxina CDT de *C. jejuni*, la subunidad B contiene solo dos residuos de lisina lo que la haría resistente a procesos de ubiquitinación, con lo cual se podría explicar su alta actividad aun en concentraciones muy pequeñas ⁽¹⁴⁾.

Varias toxinas bacterianas como la toxina de la difteria o la toxina del ántrax entran al citosol de la célula en respuesta al pH bajo en los endosomas, otras toxinas como la ricina, la toxina del cólera y la toxina de *Shigella* son transportadas no solo a los endosomas sino que avanzan por una ruta retrograda hacia el aparato de Golgi y después al retículo endoplásmico donde la parte activa enzimáticamente entra al citosol. El modelo de actividad de la toxina CDT de *C. jejuni* implicaría la misma ruta adicionándose al final su translocación al núcleo de la célula donde ejercería su acción. En este aspecto, la inyección o electroporación de la subunidad B en células ha mostrado ser suficiente para que esta ejerza su actividad toxica, lo cual confirma la idea de que la toxina debe ser

trasladada hasta el retículo endoplásmico y una vez ahí, debe de salir para realizar su actividad ⁽²³⁾.

3.5 Tránsito vesicular y citoesqueleto.

La endocitosis realiza un gran número de funciones celulares incluyendo la toma de nutrientes, la regulación negativa de factores de crecimiento, la homeostasis en la superficie celular, transmisión sináptica y la defensa en contra de microorganismos patógenos. La regulación de la vía de endocitosis está cercanamente acoplada a la habilidad de las células para reconocer, responder y adaptarse a estímulos externos. Diferentes mecanismos endocíticos, incluyendo la endocitosis mediada por clatrin, la endocitosis mediada por caveolae/rafts, macropinocitosis y transiciones entre endosomas, son reguladas por moléculas de señalamiento y también por si mismas contribuyen en rutas de señalamiento. Mientras la endocitosis mediada por clatrin constituye la principal ruta para la endocitosis de ligandos extracelulares y membrana plasmática, otra ruta alterna que participa activamente en la endocitosis de partículas extracelulares, asociadas a regiones conocidas como *lipid rafts*, es el proceso llamado caveolae, el cual está involucrado en la homeostasis del colesterol, en el reciclamiento de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol, transporte de glicoesfingolípidos y transición de componentes del suero. La caveolina es esencial para la formación de caveolae, en su ausencia no se ha podido observar caveolae. La caveolina ha sido encontrada, además de la membrana plasmática, en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico. Las vesículas formadas durante la endocitosis mediada por caveolina no acumulan ligandos removidos por endocitosis mediada por clatrin por lo que constituyen dos rutas independientes. Algunos virus o toxinas utilizan esta vía para llegar al retículo endoplásmico, por ejemplo el virus SV40 y la toxina del cólera. Dada la similitud estructural de la toxina CDT con la toxina del cólera, esta ruta podría estar involucrada en la entrada de la toxina CDT de *C. jejuni* ⁽²⁵⁾.

Dentro de todas las células eucariotas existe una estructura proteica que forma un esqueleto (llamado también citoesqueleto), el cual mantiene la organización de la célula y le permite posicionar sus orgánulos y vesículas durante el tránsito intracelular. En este citoesqueleto se han logrado identificar varios tipos de filamentos: los microtúbulos, los microfilamentos (filamentos de actina principalmente) y los filamentos intermedios. Los microtúbulos y microfilamentos se polimerizan y despolimerizan de acuerdo a diferentes situaciones. Los filamentos del citoesqueleto básicamente consisten en polímeros unidos por enlaces no covalentes, con distintos diámetros. Los microfilamentos tienen un diámetro de 7 a 9 nm, los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro y los microtúbulos de 24 nm. La actina, es el monómero estructural de los filamentos, y es también la proteína intracelular más abundante en eucariotes. Existen dos monómeros distintos de esta proteína, la G-actina y la F-actina. La actina se puede encontrar dentro de la célula en dos arreglos distintos, uno con forma de ramillete y otro con forma de filamentos entrecruzados. La forma de ramillete se presenta principalmente en la periferia de la célula y participa en la formación de microvelocidades y filopodios. Las redes entrecruzadas sirven de soporte a la célula ocupando todo el citosol. Los microtúbulos, por su parte, son polímeros de la proteína tubulina que participan también en la estructura interna de la célula, básicamente dando soporte a los cilios y permitiendo el movimiento de vesículas intracelularmente, con la acción de proteínas motoras. Las proteínas motoras asociadas a microtúbulos que movilizan organelos y vesículas son las quinesinas, dineínas y dinaminas, sin la organización de la red de microtubulos, estas proteínas motoras no pueden realizar sus

Dentro de todas las células eucariotas existe una estructura proteica que forma un esqueleto (llamado también citoesqueleto), el cual mantiene la organización de la célula y le permite posicionar sus orgánulos y vesículas durante el tránsito intracelular. En este citoesqueleto se han logrado identificar varios tipos de filamentos: los microtúbulos, los microfilamentos (filamentos de actina principalmente) y los filamentos intermedios. Los microtúbulos y microfilamentos se polimerizan y despolimerizan de acuerdo a diferentes situaciones. Los filamentos del

citoesqueleto básicamente consisten en polímeros unidos por enlaces no covalentes, con distintos diámetros. Los microfilamentos tienen un diámetro de 7 a 9 nm, los filamentos intermedios de 10 nm de diámetro y los microtúbulos de 24 nm. La actina, es el monómero estructural de los filamentos, y es también la proteína intracelular más abundante en eucariotes. Existen dos monómeros distintos de esta proteína, la G-actina y la F-actina. La actina se puede encontrar dentro de la célula en dos arreglos distintos, uno con forma de ramillete y otro con forma de filamentos entrecruzados. La forma de ramillete se presenta principalmente en la periferia de la célula y participa en la formación de microvellocidades y filopodios. Las redes entrecruzadas sirven de soporte a la célula ocupando todo el citosol. Los microtúbulos, por su parte, son polímeros de la proteína tubulina que participan también en la estructura interna de la célula, básicamente dando soporte a los cilios y permitiendo el movimiento de vesículas intracelularmente, con la acción de proteínas motoras. Las proteínas motoras asociadas a microtúbulos que movilizan organelos y vesículas son las quinesinas, dineínas y dinaminas, sin la organización de la red de microtubulos, estas proteínas motoras no pueden realizar sus acciones dirigiendo el tránsito vesicular (26).

En este trabajo se pretende demostrar que la toxina CDT utiliza el citoesqueleto y la endocitosis mediada por caveolae para alcanzar el núcleo de la célula. Conocer detalladamente la ruta intracelular que sigue la toxina CDT hacia el núcleo, lugar donde la actividad del componente B daña el ADN de la célula permitirá conocer aspectos moleculares de la patogénesis de la campilobacteriosis, lo cual permitirá proponer estrategias novedosas para su control.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿La actividad citotóxica de la toxina CDT de *Campylobacter jejuni*, es dependiente del citoesqueleto para su endocitosis y translocación al núcleo?

5. HIPÓTESIS.

La toxina CDT de *Campylobacter jejuni* emplea en su ruta intracelular, la endocitosis mediada por caveolinas y microfibras del citoesqueleto.

6. OBJETIVOS.

6.1 GENERAL.

Conocer la ruta intracelular que sigue la toxina CDT de *Campylobacter jejuni*, mediante ensayos de inhibición del citoesqueleto, con el fin de entender los mecanismos involucrados en su tránsito.

6.2 ESPECÍFICOS.

1. Amplificar, clonar y expresar cada una de las subunidades que componen a la toxina CDT de *Campylobacter jejuni*, con el fin de generar una toxina recombinante.
2. Realizar ensayos de citotoxicidad con la toxina recombinante y toxina nativa de la toxina CDT en células HeLa.
3. Bloquear el tránsito intracelular de la toxina con el uso de Latrunculina A y Nocodazole en células HeLa.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Se utilizó una cepa de referencia de *C. jejuni* ATCC 33291 y siete aislamientos de casos clínicos de *C. jejuni*, donados por el Instituto de Biotecnología, UNAM. Estas cepas se cultivaron en agar campylobacter (Oxoid, EUA) suplementado con 5% de sangre completa de borrego, en condiciones de microaerobiosis (5% O₂ y 10% CO₂) por 48 h, a 37° C.

7.2 Extracción de ADN de *C. jejuni*.

La extracción de ADN se realizó mediante el método descrito por Pitcher y colaboradores⁽²⁷⁾. El crecimiento puro de *C. jejuni*, se recuperó en 10 ml de solución PBS pH 7.2, y se centrifugó a 10,000 x g por 10 min. La pastilla recuperada por centrifugación se resuspendió en 100 µl de solución T:E (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8) (JT. Baker, México). Posteriormente se adicionaron 550 µl de solución de lisis (5 M Tiocianato de guanidina, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.5% Sarcosyl, 50µg/ml RNAasa) (Sigma,EUA) se mezcló por 3 min en un agitador mecánico. Se adicionaron 250 µl de acetato de amonio 7.5 M (JT. Baker, México) y se incubó en hielo por 10 min. Subsiguientemente se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (JT. Baker, México), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 10,000 x g por 5 min. El sobrenadante fue recuperado y se le adicionó 0.7 volúmenes de isopropanol absoluto (Sigma, EUA). El ADN fue obtenido por centrifugación a 12,500 x g por 12 min / 4° C. La pastilla de ADN recuperada fue lavada dos veces con etanol al 70% (JT. Baker, México) secada en baño María a 56°C y resuspendida en 50 µl de solución T:E. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro (Beckman Coulter,EUA).

7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *cdt* de *C. jejuni*.

La amplificación de los genes cada una de las subunidades de la toxina CDT, se llevó a cabo por la técnica de PCR. En un volumen final de 50 μ l, cada reacción de PCR contuvo: 1 ng de ADN de *C. jejuni*, 100 pmol de cada oligonucleótido (IDT, EUA) y 2 unidades internacionales (UI) de Taq polimerasa (Invitrogen, EUA). Las secuencias de los oligonucleótidos, tamaños de los productos amplificados y condiciones de la PCR, se muestran en la Tabla 1. La visualización de los productos amplificados por PCR se realizó mediante geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, EUA).

7.4 Células Competentes para la transformación.

Se tomó una colonia de la cepa *E.coli* BL21pLysS y se incubó en 5 mL de caldo YT2X (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura y 5.0 g/L NaCl) sin ampicilina a 37°C toda la noche en agitación a 220 rpm. Se tomaron 200 μ L del cultivo y se inocularon en 50 ml de caldo YT2X sin ampicilina, se incubó a 37°C en agitación a 220 rpm hasta que se obtuvo una OD₅₅₀≈0.6, la cual se midió en un espectrofotómetro modelo DU 730 (Beckman-Coulter, EUA). Una vez que el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 ml de solución TB pre enfriada (10mM PIPES, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl) y se incubó durante 10 min en hielo, pasado este tiempo, se centrifugó por 10 min a 3000 rpm a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 2ml de solución TB con 150 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido), se mantuvo 10 min en hielo, mientras se realizaron alícuotas de 100 μ l, inmediatamente después los microtubos se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

7.5 Clonación de los fragmentos amplificados de CDT.

El vector de clonación pBAD-TOPO® (Invitrogen®,EUA) es un vector de expresión que posee un residuo de timidina (T) libre en cada uno de sus extremos 3', esto

permite ligar insertos de PCR que contienen en sus extremos 3' un residuo de adenina (A) libre añadido por la Taqpolimerasa. Además, posee 6 histidinas en el extremo C-terminal, un epítipo de V5, un gen de resistencia a ampicilina y el promotor *araBAD* (Figura 3).

Los productos de CDT amplificados fueron clonados en el vector de expresión pBAD-TOPO (Invitrogen, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando células competentes de *Escherichia coli* BL21pLysS (Invitrogen, EUA) mediante transformación química, generando los vectores de expresión: pBAD-TOPO-cdtA, pBAD-TOPO-cdtB y pBAD-TOPO-cdtC.

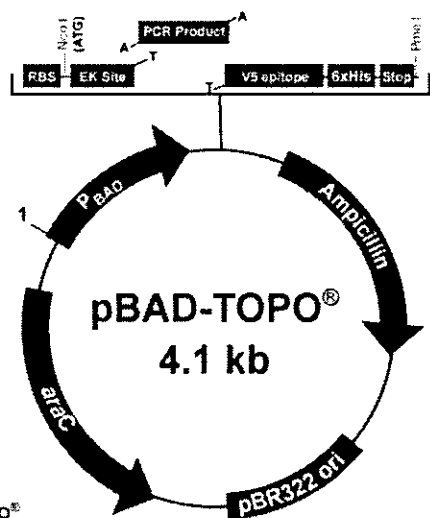


Fig.3 Esquema del vector de expresión pBAD-TOPO, usado para la clonación de los fragmentos de CDT.

Para clonar los amplificados de CDT, en un volumen final de 6 µl se mezclaron de manera cuidadosa los siguientes reactivos: 2 µl del producto de PCR, 2 µl de agua estéril, 1 µl de solución salina (proporcionada por el fabricante) y 1 µl del vector pBAD-TOPO, esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

Para la transformación de células competentes, primero se descongeló un vial de células (*E.coli* BL21pLysS) colocándolo en hielo. Una vez descongelado se adicionaron los 6 µl de la reacción de clonación, se mezcló suavemente e inmediatamente se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó

un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y rápidamente se volvió a colocar en hielo por 2 min; a este tubo se agregaron 250 µl de medio SOC (2% de triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubó a 37 °C con agitación por 1 hora. Finalmente, las transformantes obtenidas se seleccionaron en cajas de agar Luria-Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100 µg/mL) (Sigma, EUA), para ello se tomaron 100 µl de la transformación y se sembraron en placas de LB y se incubaron a 37 °C toda la noche. Las colonias obtenidas de esta transformación se designaron como: *E. coli* BL21pHis-cdtA, *E. coli* BL21 pHis-cdtB y *E. coli* BL21 pHis-cdtC.

7.6 Extracción de plásmido mediante lisis alcalina.

Se eligieron al azar colonias transformadas en agar LB con ampicilina y a éstas se les realizó la extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina usando el protocolo descrito por Sambrook ⁽²⁸⁾. Brevemente, cada una de las colonias crecidas se transfirió a un matraz previamente adicionado con 50 mL de medio LB líquido con ampicilina (1 µg/ 1 mL) y se incubaron a 37 °C con agitación durante toda la noche. Pasado este tiempo, se tomaron los 50 mL del medio y se colocaron en tubos de fondo cónico de 15 mL, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante, se suspendieron las pastillas en 200 µl de solución de lisis I fría (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM y EDTA 10 mM) (JT. Baker, México), se homogenizaron vigorosamente con ayuda de un agitador mecánico y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Pasada la incubación, se adicionaron 400 µl de solución de lisis II preparada al momento (NaOH 0.2 N, SDS 1%) (JT. Baker, México) se mezclaron por inversión y se incubaron a 4 °C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 300 µl de solución lisis III fría (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial) (JT. Baker, México) se mezclaron por inversión y se incubaron a 4 °C durante 5 min; se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (25:25) (JT. Baker, México) y se mezclaron con agitador mecánico hasta homogenizar, se centrifugó a 13,000 rpm

durante 2 min. Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo y se precipitaron con 0.6 volúmenes de isopropanol (Sigma,EUA), se mezcló por inversión y se incubaron a 4 °C por 5 min; se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante por decantación y se lavaron las pastillas con 1 mL de etanol frío al 70%, se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 2 min; se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente. Finalmente, las pastillas se suspendieron en 250 µl de solución TE (tris (hidroximetil) aminometano-ácido etilendiaminotetraacético 10:1 mM pH 8) y se les agregó 10 µl de RNasa (100 µg/ mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA), se mezclaron e incubaron durante 30 min a 37 °C. Se observó la integridad de cada ADN plasmídico, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

7.7 Selección de plásmidos en dirección correcta.

Con la finalidad de corroborar que las colonias transformadas contenían el inserto en la dirección correcta y pudieran ser expresadas de manera exitosa, se realizó una PCR de dirección; para la cual se diseñó un iniciador (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular-UNAM, Mex.) basado en la secuencia específica del vector de expresión pBAD-TOPO, a este iniciador se le denominó Fw-Dirección.

Cada colonia transformada fue sometida a 2 reacciones de PCR, cada una de las reacciones tenía un volumen final de 50 µl, los cuales contenían los siguientes reactivos: Primera reacción (Reacción 1), se añadieron 2 µl de cada uno de los iniciadores cyt-1 y Fw-Dirección a una concentración de 10 µM, 45 µl de PCR Supermix y 1 µl de ADN plasmídico con una concentración de 10ng; en esta reacción no se esperaba ningún amplificado, de tal forma que si se presentaba alguna amplificación ésta indicaría que el vector fue insertado en sentido contrario y no sería expresado.

Segunda reacción (Reacción 2), se mezclaron 2 µl de cada uno de los iniciadores, en esta ocasión cyt-2 y Fw-Dirección a una concentración de 10 µM, 45 µl de PCR Supermix y 1 µl de ADN plasmídico con una concentración de 10ng. Finalmente,

para esta reacción el producto esperado sería el adecuado, indicando que el inserto se encontraba en la dirección correcta y podía ser expresado. Las secuencias de los iniciadores, tamaños de los productos amplificados y condiciones de la PCR, se muestran en la Tabla 2.

7.8 Purificación y secuenciación de plásmidos.

Se realizó la purificación de todos aquellos plásmidos en dirección correcta, mediante columnas comerciales Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los plásmidos purificados fueron secuenciados por la compañía MACROGEN Inc. (Seul, Corea). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron analizadas utilizando el programa DNAMAN (Lynnon-Biosoft, EUA) y la búsqueda de homologías entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, se realizó mediante los programas BLAST, FASTA en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La elaboración de árboles filogenéticos se llevaron a cabo con el programa MEGA V7.

7.9 Inducción de la expresión de las proteínas CDT en *Escherichia coli* BL21pLysS.

Las colonias transformantes (*E. coli* BL21pHis-*cdtA*, *E. coli* BL21 pHis-*cdtB* y *E. coli* BL21 pHis-*cdtC*) se inocularon por separado en 10 ml de medio LB con ampicilina, incubándose a 37°C con agitación de 100 rpm, hasta alcanzar una D.O.600nm de 0.6, a esta densidad óptica se indujo la expresión con arabinosa 100mM de concentración final y se les dejó incubando por 4 h más. Se centrifugaron los cultivos a 8 000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla celular obtenida se almacenó a -70°C.

7.10 Purificación de las proteínas CDT con columnas de Níquel.

Las pastillas obtenidas de la inducción de la expresión, fueron purificadas empleando columnas de Níquel “Ni-NTA Agarose Purification of 6xHis-tagged” (Qiagen,EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenidas las proteínas CDT purificadas, se procedió a realizar una precipitación con ácido

tricloroacético (CCl_3COOH) al 20 % (JT. Baker, México). Se utilizaron 200 μl de la proteína purificada y se mezclaron con 200 μl de ácido tricloroacético al 20%, esta mezcla se mantuvo en hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13500 rpm por 5min a 4°C, la pastilla obtenida fue mezclada con 300 μl de acetona fría. Se volvió a centrifugar a 13500 rpm por 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y la pastilla se analizó mediante el método de SDS-PAGE.

7.11 Análisis de proteínas purificadas en SDS-PAGE.

Cada una de las proteínas CDT purificadas y precipitadas, se prepararon con Buffer de Muestra 1x (25mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 1% β -mercaptoetanol, 15% glicerol, 0.005% azul de bromofenol), se mezclaron por inversión, y se sometieron a ebullición en baño de agua por 5 min.

Se utilizaron geles separadores al 12% (0.375M Tris pH 8.8) y geles concentradores al 4% (0.125 M Tris pH 6.8). La concentración de proteína analizada en el gel fue de 100 μg y como marcador de peso molecular se utilizó el Pageruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, EUA), se realizó el corrimiento electroforético en Buffer Tris-Glicina 1x a 70V/20mA por 4 h y se tiñó en solución de Azul de Coomassie.

7.12 Detección de las proteínas CDT por Western Blot.

Después del corrimiento electroforético se realizó la transferencia de las proteínas en el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (Millipore, EUA). La electrotransferencia se llevó a cabo a 100V/200mA a 4°C por 1h, en un aparato Mini Trans-blot (Bio-Rad, México). Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con Rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 min.

Se eliminó el colorante por medio de 3 lavados de 5 min con TBS-T 0.05% (100mM Tris pH8, 150mM NaCl y 0.05% de Tween-20). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 1%, se dejaron por 1h en agitación suave a temperatura ambiente, con el fin de bloquear los sitios de unión no específicos en la membrana. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T 0.05%, para eliminar restos de leche, en seguida las membranas se incubaron con cada anticuerpo

primario durante la noche a temperatura ambiente con agitación suave. Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBS-T 0.05% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación leve, con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa (HRP). Tanto los anticuerpos primarios como secundarios fueron preparados en leche descremada al 2 % en TBS-T 0.05% a las respectivas diluciones, que se muestran en la Tabla 3.

7.13 Elaboración de anticuerpos policlonales específicos contra *Campylobacter jejuni*.

Para la inducción de la producción de anticuerpos se utilizaron 3 conejos Nueva Zelanda hembras de 2kg y como conjugado se manejó una mezcla (v/v) de *Campylobacter jejuni* (ATCC)/carbopol (Acofarma, España). Cabe aclarar en este punto que con el fin de estimular la producción de anticuerpos se utilizó carbopol como coadyuvante. El periodo de inmunización se llevó a cabo por 12 semanas, como se muestra en la Tabla 4. El suero obtenido, fue utilizado para la detección de proteínas recombinantes, previo tratamiento de absorción.

7.14 Absorción de Sueros.

Con el fin de eliminar anticuerpos antibacteriales expresados por la cepa de *Escherichia coli* BL21pLysS, los sueros policlonales de conejo fueron absorbidos mediante la técnica descrita por Gruber A ⁽²⁹⁾.

Se sembró una colonia de *Escherichia coli* BL21pLysS en 400 ml de medio LB y se incubó por toda la noche a 200rpm a 37°C. Al día siguiente el cultivo bacteriano se separó en dos partes iguales, los primeros 200ml fueron esterilizados por autoclave a 121°C, 15 lb por 1h. Los 200 ml restantes fueron tratados con formaldehído al 0.5% y se incubó a 37°C por 2h a 200rpm. Una vez transcurrido ese tiempo, se mezclaron ambas suspensiones y se centrifugaron a 5000rpm por 10 min. La pastilla obtenida se lavó con 200ml de PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ y 2mM KH₂PO₄) y se alicuotó en 8 tubos (cada uno con 50 ml) y se volvió a centrifugar a 7000rpm por 10 min. La pastilla obtenida de un tubo, se

resuspendió en 15 ml de PBS + 1:50 del suero policlonal de conejo + 1% de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, EUA) y se incubó a 4°C en agitación por 2h. Finalmente, se centrifugó a 7000rpm por 10 min y el sobrenadante obtenido es el suero que se analizó por Western Blot.

7.15 Preparación de la toxina nativa de la toxina CDT.

La obtención de la toxina nativa de la toxina de distensión citoletal se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Whitehouse ⁽³⁰⁾.

Se creció la cepa ATCC de *C. jejuni* en cajas con agar Brucella a 37°C por 48h en condiciones de microaerobiosis. Seguido este tiempo, se recolectó todo el crecimiento bacteriano en 1ml de PBS y se centrifugó a 10000rpm por 10 min. La pastilla obtenida se reconstituyó en 5ml de PBS + 5mg de lisozima y se dejó incubando por 30 min en hielo. Transcurrido este lapso, se sonicó por 6 tiempos de 10 segundos cada uno a una intensidad alta y en frío; posteriormente el lisado se centrifugó a 10000rpm por 20 min a 4°C para remover todas aquellas células que no fueron lisadas, y se ultracentrifugó dos veces, la primera a 45000 rpm por 60 min a 10°C, con el fin de sedimentar los fragmentos membranales y la segunda a 45000 rpm por 60 min a 20°C.

Los extractos de la toxina nativa que se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad fueron los sobrenadantes de la primer ultracentrifugación, los cuales fueron evaluados por SDS-PAGE y cuantificados por la técnica de Bradford ⁽³¹⁾.

7.16 Cultivo y Ensayo de citotoxicidad en células HeLa.

Se utilizó la línea celular HeLa - ATCC CCL-2 (ATCC, USA), la cual se cultivó en medio MEM (medio mínimo esencial) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 2mM de L-glutamina y 0.1mM de piruvato de sodio (todos los reactivos Gibco,EUA).

Para los ensayos de citotoxicidad se cultivaron las células HeLa (5×10^4 cels/ml) en microplacas de 24 pozos (NUNC, EUA) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 80%. Una vez obtenida la confluencia, se les añadieron 150 µg/ml de la toxina nativa de CDT. Las células

fueron examinadas cada 24 h por tres días para detectar cambios morfológicos o daño celular, en un microscopio invertido (Velab, México).

Para los ensayos de citotoxicidad fue necesario tener un control de daño celular, por ello se utilizó 50 μ M de etopósido (VP-16-Lemery, México) en 10ml de medio de cultivo MEM suplementado con el 10% de SFB, el cual fue administrado a las células por 3h y lavado 2 veces con SFB sin suero. A continuación, las células se mantuvieron en MEM con SFB y se observaron por 48 h.

7.17 Ensayos de Fluorescencia.

Las células HeLa (1×10^3) fueron cultivadas en portaobjetos tratados (Nalge, Rochester- NY) y se incubaron con la preparación de la toxina CDT durante 48 h a 37 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente fueron lavadas con 1ml de PBS y se fijaron durante 15 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron con triton-100 al 0.5% por 10 min, transcurrido este tiempo las células se lavaron tres veces con PBS y se trataron con 100 μ g/ml de RNasa. Para detectar los microfilamentos de actina, se añadió 50 μ g/ml de Faloidina fluorescente (Alexa 488, Molecular Probes, EUA) por 30 min y se lavó por tres veces con 1ml de PBS. Finalmente, las células se tiñeron con 500nM de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, EUA) por 5 min y se lavó tres veces con buffer 2X-SSC (0.3M NaCl y 0.03M citrato de sodio). Los patrones morfológicos de las células fueron evaluados en un microscopio de epifluorescencia confocal (Nikon E800, Japón).

7.18 Medición de la apoptosis por fragmentación del ADN.

Las células HeLa cultivadas con la toxina fueron examinadas por microscopía en diferentes tiempos 24, 48 y 72 h para visualizar cambios morfológicos indicativos de apoptosis, como lo describe Matassov D ⁽³²⁾. Una vez transcurrido cada tiempo de infección, las células se desprendieron y se mantuvieron disueltas en 10 μ l de agua destilada esteril y se trataron con RNasa A (10 mg / ml a 37°C durante 45 min), posteriormente el ADN fue visualizado en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV en un

transiluminador (Molecular Imager Gel Doc XR, BioRad, EUA). Las células expuestas a 50 mM de etopósido, se utilizaron como control positivo.

7.19 Tratamiento con inhibidores del citoesqueleto.

Las células HeLa fueron tratadas ya sea con 1 μ M de latrunculina-A (Sigma-Aldrich,EUA) un disruptor de la organización de microfilamentos de actina y/o con 30 μ M de nocodazole, un disruptor de los microtúbulos (Sigma-Aldrich,EUA). Los fármacos estuvieron presentes en las células Hela durante 30 min antes del ensayo de infección con la toxina y fueron evaluados cada 24 h por 2 días.

7.20 Extracción de proteínas de células tratadas con la toxina CDT.

Las células HeLa tratadas con la toxina y con los inhibidores fueron lavadas dos veces con PBS pH 7.2 para eliminar restos de medio cultivo, en seguida las células se resuspendieron y se lisaron con solución RIPA [1% (v / v) de Triton X-100, 1% (v / v) de desoxicolato de sodio, 0.1% (v / v) de dodecil sulfato de sodio (SDS), 20 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 150 mM, y 1 mM EDTA en agua destilada] (Thermo Scientific -Pierce, EUA.) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (GE Healthcare, EUA.) durante 5 min a 4°C.

Después de eso, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes resultantes se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford. 50 μ g de proteína del material citotóxico aislado se mezcló con un volumen igual del buffer de muestra 2X con β -mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio. La muestra se hirvió durante 5 min y se separó por SDS-PAGE en un gel al 12%.

7.21 Inmunocuantificación de Cdc2-fosforilado.

La determinación de Cdc2-fosforilado (P-Cdc2) se realizó mediante la técnica de ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). En microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, se fijaron 100 μ l de anticuerpo monoclonal de conejo P-Cdc2 (Cell Signaling Technology, EUA) a una dilución de 1:1000 en PBS pH 7.2 y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavaron tres veces con 250 μ l/ pozo de PBS pH 7.2 adicionado con 0.05% de Tween-20 (PBS-T). Después se bloquearon con 100 μ l/ pozo de una solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% durante 12 horas a temperatura ambiente; pasado este tiempo, se lavaron tres veces con PBS-T. Se incubaron con: 10 μ g/ μ l de la toxina, 10 μ g/ μ l μ M de etopósido, 6 μ g/ μ l de latrunculina A, 4 μ g/ μ l nocodazol y combinaciones toxina/latrunculinaA, toxina/nocodazol y toxina/latrunculina/nocodazol de durante 2 horas a 37 °C; una vez pasado el tiempo de incubación, se lavaron tres veces con PBS-T y se agregaron 100 μ l de anticuerpos primarios : anti b-actina (control), anti-Cdc2 y anti-P-Cdc2 (todos los anticuerpos de (Cell Signaling Technology, EUA) a una dilución de 1:1000 en PBS pH 7.2 y se incubaron durante 2 h a 37 °C, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-T. Para la detección del segundo anticuerpo, se añadió un anti-IgG de conejo-HRP (Rockland, EUA) a una dilución de 1: 1000 en PBS pH 7.2 y se incubaron durante 2 h a 37 °C y se efectuaron tres lavados con PBS-T. Finalmente, se adicionaron 100 μ l del sustrato cromógeno, ácido 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzhiiazoline-6-sulfónico (ABTS) (Sigma-Aldrich,EUA) y 1 μ l/ 10 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ambos diluidos en una solución amortiguadora de citratos pH 4.0 (Ácido cítrico 109 mM y citrato de sodio 99 mM). Las placas se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min y se realizaron las lecturas en un lector de microplacas modelo 680 (BioRad, EUA), usando una longitud de onda de 405nm. Las lecturas se llevaron a cabo cada 5min hasta completar 20 min. Con los resultados obtenidos, se realizó un análisis de varianza.

7.22 Análisis del ciclo celular.

Para poder establecer la proporción de células en cada fase del ciclo celular, se estudió el contenido de ADN en células Hela de cada uno de los tratamientos antes descritos. Para ello, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS, centrifugadas a 800 rpm por 5min y el sedimento celular se resuspendió en 1ml de PBS. Posteriormente, las células se fijaron con 1ml de etanol frío al 70% por 15 min, transcurrido ese tiempo, las células se volvieron a centrifugar a 800 rpm

por 5min y se resuspendieron en 1 ml de solución de yoduro de propidio (PI) (0.05 mg/ml PI, 0.02 mg/ml de RNasa, 0.3% de NP40, 1 mg/ml de citrato de sodio) durante 1 h a 4°C en oscuridad.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSort (Becton-Dickinson, EUA). Los datos de 10^5 células se recogieron y se analizaron usando el software CellQuest (Becton y Dickinson).

7.23 Análisis estadístico.

Los resultados fueron recolectados y analizados mediante un análisis de varianza ANOVA entre los diferentes grupos de estudio. La significancia estadística fue establecida cuando $p \leq 0.5$.

8. RESULTADOS.

8.1 Detección y análisis de los genes *cdt* en *Campylobacter jejuni*.

Se determinó la presencia de los tres genes que comprenden el operón CDT en los siete aislados y la cepa de referencia. Resultando para cada uno ellos un sólo producto de amplificación, correspondiente a la secuencia amplificada por cada uno de los iniciadores diseñados para cada gen, obteniendo los siguientes amplificados: *cdtA*= 807pb, *cdtB*= 781pb y *cdtC*= 570pb (Figura 4). Estos datos mostraron la presencia de los genes que codifican a la toxina de distención citoletal, en las cepas analizadas.

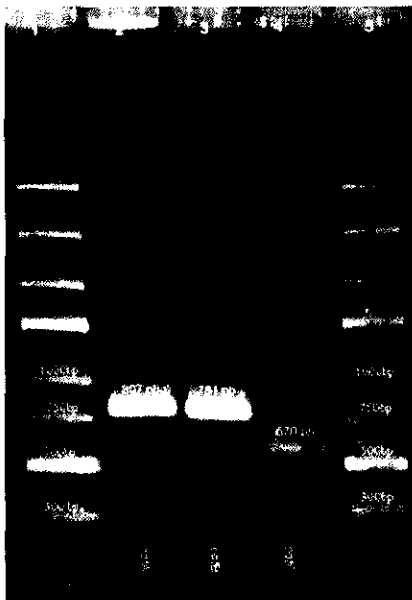
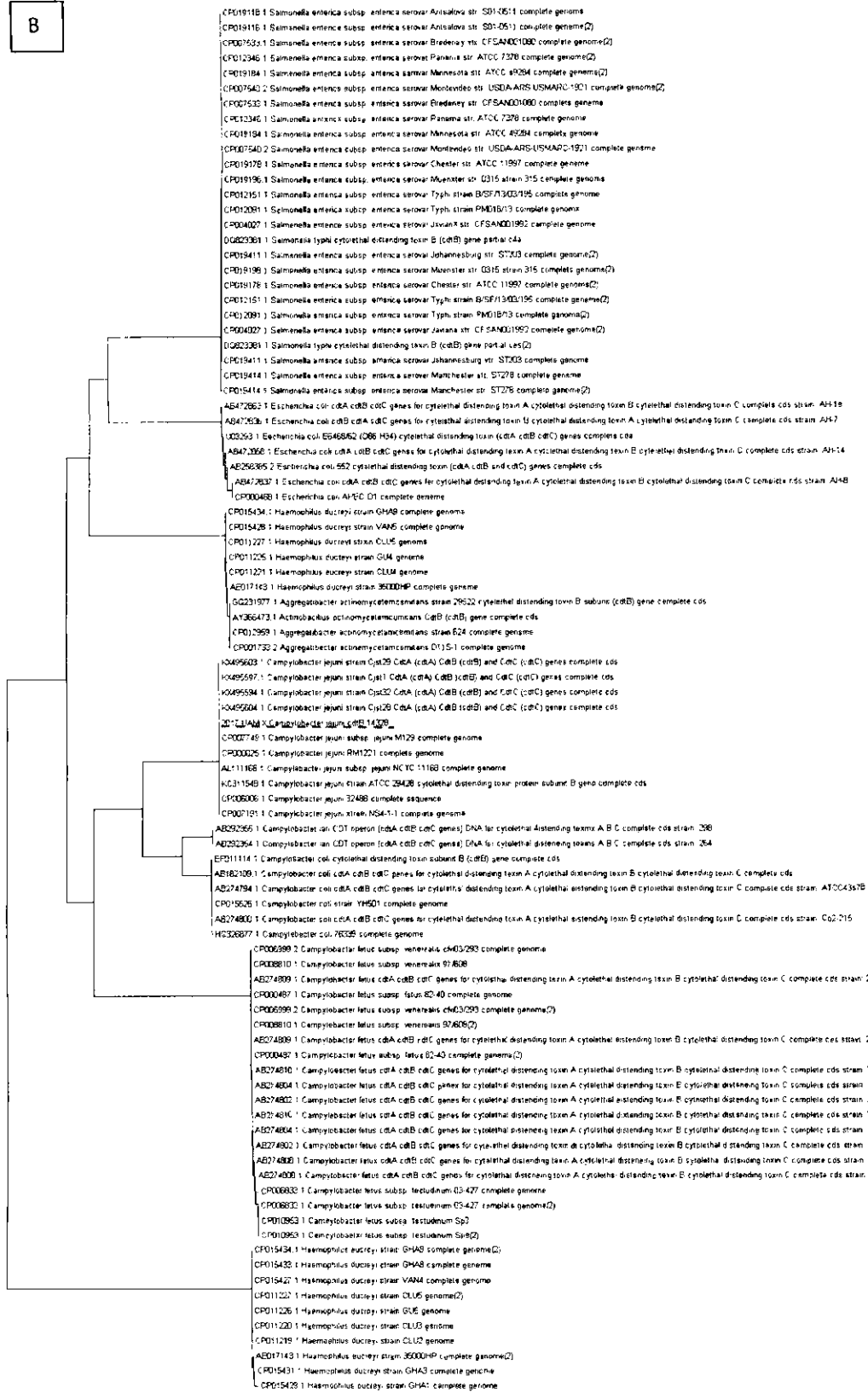


Fig.4 PCR de la toxina CDT de *C. jejuni*. Foto de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1y5: Marcador de Peso Molecular Gene Ruler Express (Fermentas, EUA). Carril 2: Producto de PCR del gen *cdtA*. Carril: 3 Producto de PCR del gen *cdtB*. Carril: 4 Producto de PCR del gen *cdtC*.

De una de las cepas (cepa de referencia), se obtuvieron las secuencias de los productos amplificados, correspondientes a *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*. Las secuencias fueron analizadas para identificar homologías con otras especies y géneros que poseen también una toxina CDT. Las secuencias obtenidas de la base de datos del GeneBank, fueron alineadas con CLUSTAWL y este alineamiento se usó para elaborar un árbol de similitud, utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ) con el programa (MEGA v7). (Figura 5).

B



2

C

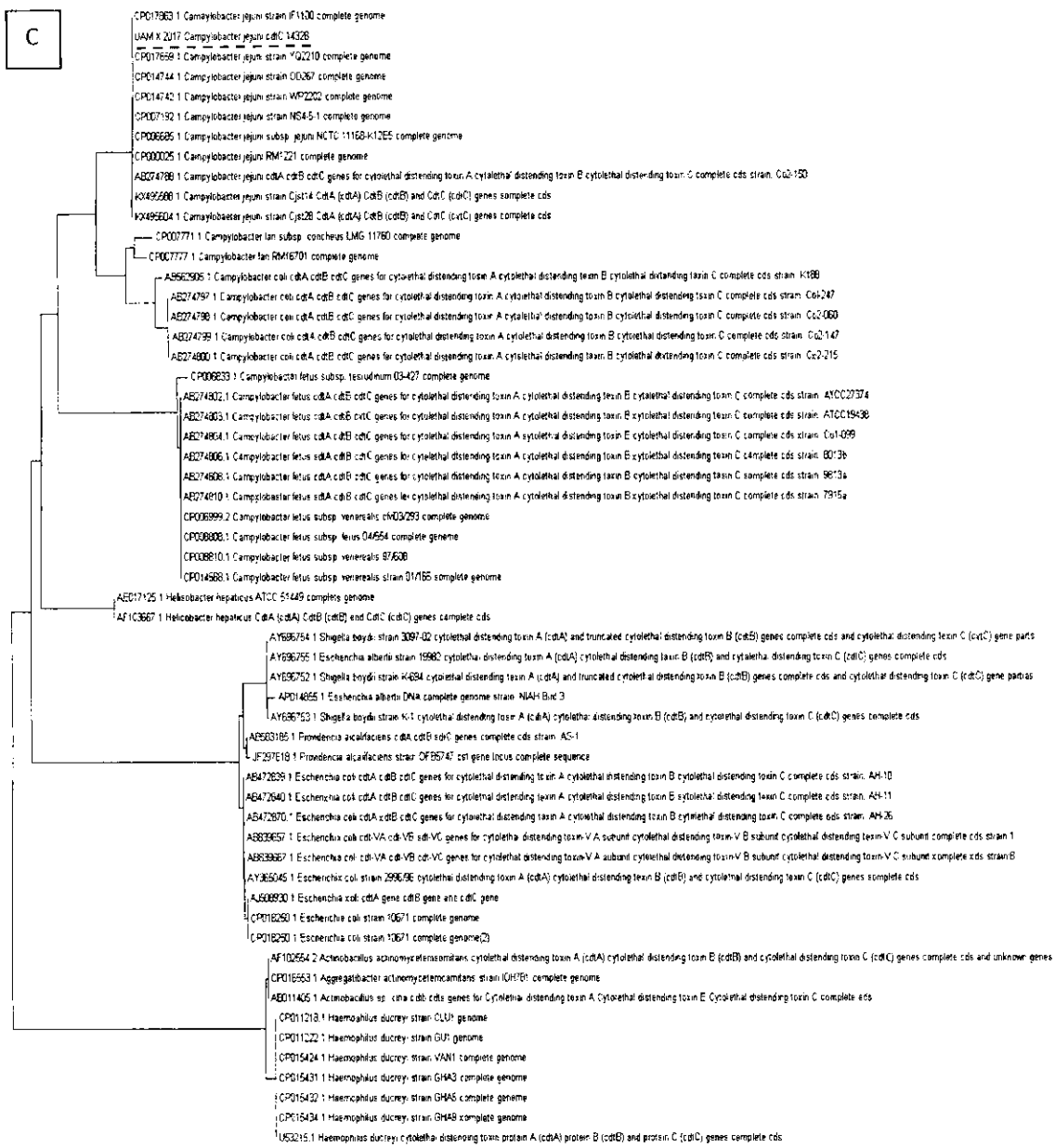


Figura 5. Árbol de similitud del gen *cdt*.
 Se muestra la similitud en secuencias de los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* entre diferentes géneros. En rojo se resalta la secuencia *C. jejuni* que se utilizó en este trabajo.

Los genes que codifican la toxina CDT ha sido identificados en diversos géneros de bacterias Gram negativas ^(15,16), con el análisis de similitud se pudo establecer que la cepa de referencia mantiene una alta similitud a nivel de secuencia nucleotídica entre el género *Campylobacter*, así como con otros géneros como son: *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Helicobacter* spp, *Providencia* spp, *Salmonella* spp, *Actinobacillus* spp y *Haemophilus* spp.

8.2 Digestión de los productos de amplificación por PCR.

Previo a la obtención de la secuencia nucleotídica de cada uno de los genes del operon CDT, los productos amplificados fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (*Hind III*, *Sau3A*, *DraI*, *EcoRI*, y *EcoRV*), con el fin de corroborar cada fragmento amplificado con su patrón de digestión, predicho por el programa de cómputo DNAMAN-Lyon. Los fragmentos generados en cada subunidad de CDT se muestran en la tabla 5 y Figura 6. Como se aprecia en esta figura los fragmentos obtenidos para *cdtA* digerida con la enzima *HindIII* fueron 807, 514 y 293 pb aproximadamente, lo que corresponde con predicho por el programa. Así mismo los fragmentos obtenidos para *cdtB* digerido con la enzima *EcoRI*, fueron de 379 y 419 pb aproximadamente, lo que nuevamente coincide con lo predicho con el análisis hecho con la secuencia. De igual manera el análisis de restricción hecho con el fragmento correspondiente a *cdtC*, coincidió con lo predicho por el programa.

8.3 Clonación de los productos de PCR.

Una vez terminada la transformación, diez colonias seleccionadas en agar LB con ampicilina (*E. coli* BL21pHis-*cdtA*, *E. coli* BL21 pHis-*cdtB* y *E. coli* BL21 pHis-*cdtC*), fueron seleccionadas para verificar la introducción del inserto en el vector. Para ello, a cada colonia se le realizó lisis alcalina para la extracción de ADN plasmídico (Figura 7), posteriormente se seleccionó una enzima de restricción que tuviera un sitio único de corte en el vector, considerando los sitios de corte presentes en el vector pBAD-TOPO y en la secuencia clonada. Bajo este enfoque, se decidió utilizar a la enzima *EcoRV*. La digestión con esta enzima

permite linearizar el vector, con lo cual se puede verificar la introducción del inserto a través del tamaño de la banda obtenida. El vector vacío sin ningún inserto mostró un peso molecular de 4.1kB, Los vectores con los insertos, correspondientes a cada producto de PCR, mostraron los siguientes tamaños: pCDT-A 4907 pb, pCDT-B 4891 pb y pCDT-C 4670 pb, esto coincidió con lo esperado.

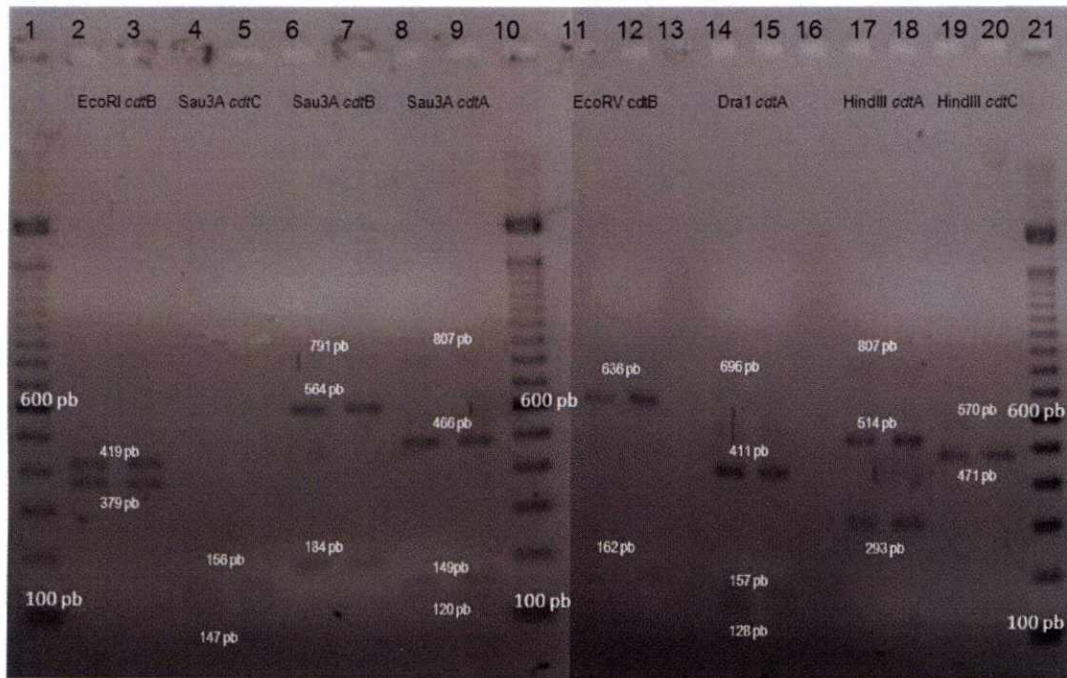


Fig.6 Corte con enzimas de restricción de las subunidades CDT de *C. jejuni*. Foto de un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1, 10 y 21: Marcador de Peso Molecular 100pb (Invitrogen, EUA). Carriles 2y3: Fragmentos generados de *cdtB*, cortados con EcoRI. Carriles 4y5: Fragmentos generados de *cdtC*, cortados con Sau3A. Carriles 6y7: Fragmentos generados de *cdtB*, cortados con Sau3A. Carriles 8y9: Fragmentos generados de *cdtA*, cortados con Sau3A. Carriles 11y12: Fragmentos generados de *cdtB*, cortados con EcoRV. Carriles 14 y15: Fragmentos generados de *cdtA*, cortados con DraI. Carriles 17y18: Fragmentos generados de *cdtA*, cortados con HindIII. Carriles 19y20: Fragmentos generados de *cdtC*, cortados con HindIII.

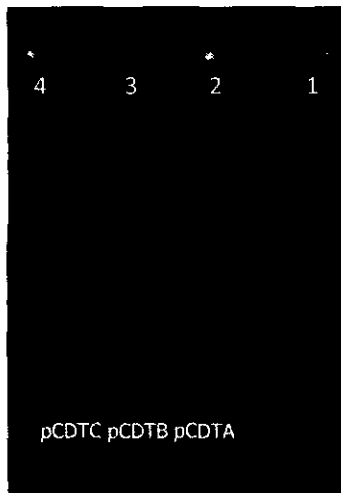


Figura 7. ADN plasmídico de las células transformadas.

Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular λ Hind III; Carril 2: *cdtA* en pBAD-TOPO; carril 3: *cdtB* en pBAD-TOPO y carril 4: *cdtC* en pBAD-TOPO.

Una vez determinado la inserción de cada producto en el vector, debido a que este podría encontrarse insertado en dirección incorrecta, fue necesario analizar la orientación. Para ello, se realizó una PCR, en la cual uno de los iniciadores se diseñó para unirse a una secuencia específica del vector de expresión pBAD-TOPO, este iniciador se le denominó Fw-Dirección (Figura 8). De esta manera la combinación de uno iniciadores para cada fragmento con el Fw-dirección, nos indicaría la dirección del inserto.

Finalmente, para corroborar que el fragmento clonado se encontraba en la orientación correcta, en marco con el extremo C-terminal del epítipo V5 y con la etiqueta de 6 histidinas, fue necesario secuenciar el constructo (Figura 9).

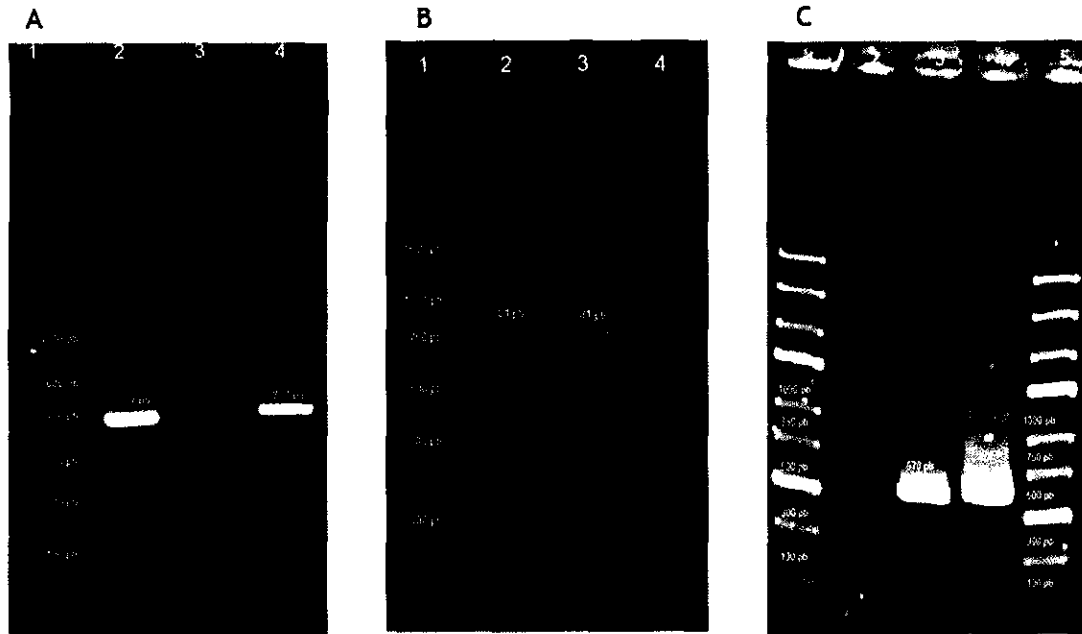
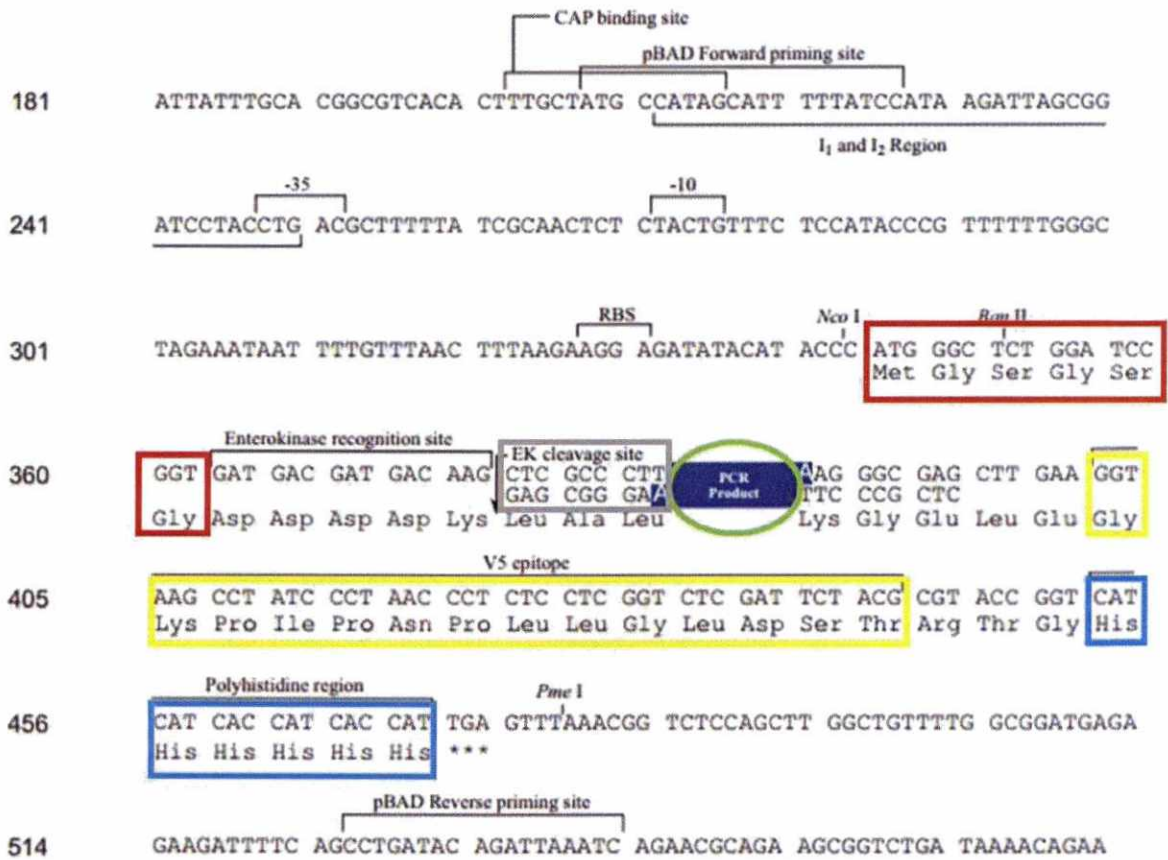


Figura 8. PCR de dirección.

Foto de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A) Carril 1: Marcador de peso molecular Gene Ruler Express; Carril 2: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytA1 +cytA2; Carril 3: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytA2 + Fw-dirección; Carril 4: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytA1 + Fw-dirección. B) Carril 1: Marcador de peso molecular Gene Ruler Express; Carril 2: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytB1 +cytB2; Carril 3: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytB1 + Fw-dirección; Carril 4: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytB2 + Fw-dirección. C) Carriles 1 y 5: Marcador de peso molecular Gene Ruler Express; Carril 2: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytC1 + Fw-dirección; Carril 3: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytC2 + Fw-dirección; Carril 4: Reacción de PCR utilizando los iniciadores cytC1 +cytC2.

A) Secuencia del pBAD-TOPO.



B) Secuenciación del pCDT-A

1 ATGGGCTCTGGATCCGGT GATGACGATGACAAGCTCGCCCTTATGCAAAAAATTATAGTT
1 METGlySerGlySerGly AspAspAspAspLysLeuAlaLeuMETGlnLysIleIleVal
61 TTTATTTTATGTTGTTTTATGACTTTTTTCTTTATGCATGTTCTTCTAAATTTGAAAAT
21 PheIleLeuCysCysPheMETThrPhePheLeuTyrAlaCysSerSerLysPheGluAsn
121 GTAAATCCTTTGGGGCGTTCATTTGGCGAATTTGAAGATACTGATCCTTTAAAAC TAGGA
41 ValAsnProLeuGlyArgSerPheGlyGluPheGluAspThrAspProLeuLysLeuGly
181 CTTGAACCTACTTTTCTACCAATCAAGAAATCCAAGTTTAATTAGCGGTGCTGATTTA
61 LeuGluProThrPheProThrAsnGlnGluIleProSerLeuIleSerGlyAlaAspLeu
241 GTACCTATTACTCCTATTACCCACCTTA ACTAGAACAAGCAATAGTGCCAACAATAAT
81 ValProIleThrProIleThrProLeuThrArgThrSerAsnSerAlaAsnAsnAsn
301 GCAGTAAATGGGATCAATCCTCGCTTTAAAGACGAAGCTTTTAATGATGTTTTAATTTTT
101 AlaValAsnGlyIleAsnProArgPheLysAspGluAlaPheAsnAspValLeuIlePhe
361 GAAAATCGCCCTGCGGTTTTCTGATTTTTTAACCATTTTAGGCCCTAGCGGAGCAGCTTTA
121 GluAsnArgProAlaValSerAspPheLeuThrIleLeuGlyProSerGlyAlaAlaLeu
421 ACGGTTTGGGCTTTAGCACAAGGAAATGGATTTCGGGGCTATACTTTAATCGATAGTAAA
141 ThrValTrpAlaLeuAlaGlnGlyAsnTrpIleArgGlyTyrThrLeuIleAspSerLys
481 GGATTTGGCGATGCTAGAGTTTGGCAACTTTTGCTTTATCCTAATGATTTTGCAATGATT
161 GlyPheGlyAspAlaArgValTrpGlnLeuLeuLeuTyrProAsnAspPheAlaMETIle
541 AAAAATGCCAAAACCAATACTTGTCTTAATGCTTATGGTAATGGAATTGTCCATTATCCT
181 LysAsnAlaLysThrAsnThrCysLeuAsnAlaTyrGlyAsnGlyIleValHisTyrPro
601 TGCGATGCAAGCAATCACGCACAAATGTGAAACTTATCCCTATGAGCAATACAGCGGTT
201 CysAspAlaSerAsnHisAlaGlnMETTrpLysLeuIleProMETSerAsnThrAlaVal
661 CAAATTA AAAATTTAGGAAATGGAAAATGCATACAAGCACCTATTACAAATCTTTATGGT
221 GlnIleLysAsnLeuGlyAsnGlyLysCysIleGlnAlaProIleThrAsnLeuTyrGly
721 GATTTTCACAAGGTTTTTAAAATTTTTACCGTAGAGTGTGCAAAAAAAGATAATTTTGAT
241 AspPheHisLysValPheLysIlePheThrValGluCysAlaLysLysAspAsnPheAsp
781 CAACAATGGTTTTTAACTACTCCGCCTTTTACCGCAAAACCTTTATATCGCCAAGGAGAG
261 GlnGlnTrpPheLeuThrThrProProPheThrAlaLysProLeuTyrArgGlnGlyGlu
841 GTACGA AAGGGCGAGCTTGAAGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCT
281 ValArgLysGlyGluLeuGluGlyLysProIleProAsnProLeuLeuGlyLeuAspSer
901 ACGCGTACCGTCATCATCACCATCACCATTGA
301 ThrArgThrGlyHisHisHisHisHisHis***

C) Secuenciación del pCDT-B.

```

1 ATGGGGCTCTGGATCCGGT GATGACGATGACAAGCTCGCCCTTATGAAAAAATTATATGT
1 METGlySerGlySerGly AspAspAspAspLysLeuAlaLeuMETLysLysIleIleCys
61 TTATTTTTATCTTTAACCTTACTTTTGCAAATTTAGAAAATTTTAATGTTGGCACTTGG
21 LeuPheLeuSerPheAsnLeuThrPheAlaAsnLeuGluAsnPheAsnValGlyThrTrp
121 AATTTGCAAGGCTCATCCGCAGCCACAGAAAGCAAATGGAGTGTAGCGTAAGACAACCTT
41 AsnLeuGlnGlySerSerAlaAlaThrGluSerLysTrpSerValSerValArgGlnLeu
181 GTAAGTGGAGCAAACCCCTTAGATATCTTAATGATACAAGAAGCAGGAACCTTTACCAAGA
61 ValSerGlyAlaAsnProLeuAspIleLeuMETIleGlnGluAlaGlyThrLeuProArg
241 ACAGCCACTCCAACAGGACGCCATGTGCAACAAGGTGGAACACCTATTGATGAATATGAG
81 ThrAlaThrProThrGlyArgHisValGlnGlnGlyGlyThrProIleAspGluTyrGlu
301 TGGAATTTAGGAACCTTTTCAAGGCCTGATAGGGTTTTTATTATTATTCTCGCGTTGAT
101 TrpAsnLeuGlyThrLeuSerArgProAspArgValPheIleTyrTyrSerArgValAsp
361 ATAGGAGCTAATCGTGAAATTTAGCTATAGTTTCAAGAATGCAAGCTGAAGAAGTGATT
121 IleGlyAlaAsnArgValAsnLeuAlaIleValSerArgMETGlnAlaGluGluValIle
421 GTTTTACCTCCACCTACTACAGTTTCAAGACCATTATAGGAATTCGCAATGGAAATGAT
141 ValLeuProProProThrThrValSerArgProIleIleGlyIleArgAsnGlyAsnAsp
481 GCTTTTTTCAATATCCATGCTTTAGCTAATGGAGGAACAGATGTAGGAGCAATTATCACA
161 AlaPhePheAsnIleHisAlaLeuAlaAsnGlyGlyThrAspValGlyAlaIleIleThr
541 GCTGTAGATGCACATTTTGCAAATATGCCTCAAGTTAACTGGATGATAGCAGGGGATTTT
181 AlaValAspAlaHisPheAlaAsnMETProGlnValAsnTrpMETIleAlaGlyAspPhe
601 AACCGTGATCCTTCTACTATAACAAGTACAGTGGATAGAGAATTAGCAAATAGAATTAGA
201 AsnArgAspProSerThrIleThrSerThrValAspArgGluLeuAlaAsnArgIleArg
661 GTGGTTTTTCCAAC TAGCGCAACTCAAGCAAGCGGAGGGACTCTTGATTATGCAATTACA
221 ValValPheProThrSerAlaThrGlnAlaSerGlyGlyThrLeuAspTyrAlaIleThr
721 GGAAATTCAAATAGACAACAAACCTATACTCCACCGCTTTTAGCTGCGATTTTAATGCTT
241 GlyAsnSerAsnArgGlnGlnThrTyrThrProProLeuLeuAlaAlaIleLeuMETLeu
781 GCAAGTTTTAAGATCTCATATAGTTTCAGATCATTTCAGTAAATTTAGAAAAAAGGGC
261 AlaSerLeuArgSerHisIleValSerAspHisPheProValAsnPheArgLysLysGly
841 GAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGT
281 GluLeuGluGlyLysProIleProAsnProLeuLeuGlyLeuAspSerThrArgThrGly
901 CATCATCACCATCACCATGTA
301 HisHisHisHisHisHisHis***

```

D) Secuenciación del pCDT-C.

```

1 ATGGGCTCTGGATCCGGT GATGACGATGACAAGCTCGCCCTTATGAAAAAATTATTACT
1 METGlySerGlySerGly AspAspAspAspLysLeuAlaLeuMETLysLysIleIleThr
61 TTGTTTTTTATGTTTATAACTTTAGCCTTTGCAACTCCTACTGGAGATTGAAAGATTTT
21 LeuPhePheMETPheIleThrLeuAlaPheAlaThrProThrGlyAspLeuLysAspPhe
121 ACCGAAATGGTTTCTATAAGAAGCTTAGAAAACGGGAATTTTTTAAAGCGCCTTAGGGAT
41 ThrGluMETValSerIleArgSerLeuGluThrGlyIlePheLeuSerAlaPheArgAsp
181 ACCTCAAAAGATCCTATTGATCAAAATTGGAATATTAAGAAAATTGTTTTAAGCGATGAG
61 ThrSerLysAspProIleAspGlnAsnTrpAsnIleLysGluIleValLeuSerAspGlu
241 TTAACAACAAAAGATAAAATTAGCTGATGAACCTCCTTTTGGTTATGTGCAATTTACAAAT
81 LeuLysGlnLysAspLysLeuAlaAspGluLeuProPheGlyTyrValGlnPheThrAsn
301 CCAAAAGAAAGCGATCTTTGTTTAGCCATCTTAGAAGATGGAACCTTTGGAGCAAAATCT
101 ThrSerGluSerAspLeuCysLeuAlaIleLeuGluAspGlyThrPheGlyAlaLysSer
361 TGTC AAGATGATCTAAAAGATGGTAAATTAGAACTGTATTTTCTATAATGCCAACAAACA
121 CysGlnAspAspLeuLysAspGlyLysLeuGluThrValPheSerIleMETProThrThr
421 ACTTCAGCTGTGCAAATTCGTTCTTTAGTTTTTGGAACTGTATGATGAATGTATAGTAACTTTT
141 ThrSerAlaValGlnIleArgSerLeuValLeuGluSerAspGluCysIleValThrPhe
481 TTTAATCCAATATTCCTATACAAAACGCTTTGGAATAGCCCCTGCACCCTAGATCCT
161 PheAsnProAsnIleProIleGlnLysArgPheGlyIleAlaProCysThrLeuAspPro
541 ATTTTTTTTGGCTGAAGTAAATGAACATAATGATTATAACCCACCTTTAACAGCTGCTACC
181 IlePhePheAlaGluValAsnGluLeuMETIleIleThrProProLeuThrAlaAlaThr
601 CCTTTAGAAAAGGGCGAGCTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGAT
201 ProLeuGluLysGlyGluLeuGluGlyLysProIleProAsnProLeuLeuGlyLeuAsp
661 TCTACGCGTACCGGT CATCATCACCATCACCAT TGA
221 SerThrArgThrGly H1SH1SH1SH1SH1SH1S ***

```

Figura 9. Secuenciación de los vectores con el inserto en dirección.

A) Estructura y secuencia del vector pBAD-TOPO, en rojo se marca la secuencia que se utilizó para diseñar el iniciador que diera la orientación correcta del inserto. En color verde se muestra el producto de PCR clonado. En color amarillo se encuentra el epítotope V5 y en color azul la etiqueta de histidinas. B) Secuencia obtenida para pCDT-A. C) Secuencia obtenida para pCDT-B. D) Secuencia obtenida para pCDT-C, en todas ellas se marcan los colores con la descripción anteriormente mencionada.

8.4 Inducción de la Expresión de la proteína recombinante.

Una vez revisada la orientación del inserto en las células transformantes *E. coli* BL21, estas fueron crecidas en agar LB con ampicilina; las colonias resultantes se utilizaron para realizar una cinética de crecimiento e inducción, para establecer la curva de crecimiento de cada transformante, así como la concentración de arabinosa más adecuada y el tiempo de inducción necesario para obtener la cantidad óptima de proteína CDT recombinante. Durante la cinética de crecimiento se observó que la bacteria comenzó su fase de adaptación en la primera hora, alcanzando su fase logarítmica a las 3-4 horas iniciada la

inducción; para la inducción de la expresión se utilizaron diferentes concentraciones de arabinosa: 0.002%, 0.02%, 0.2%, 2% y 20% (Figura10).

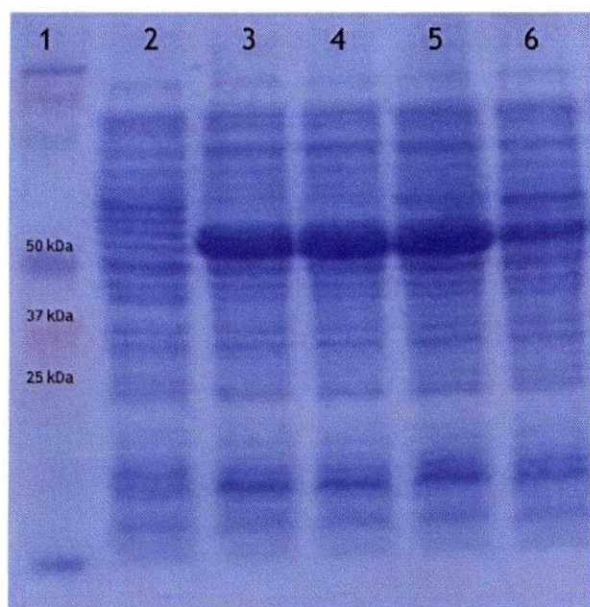


Figura 10. Estandarización de la concentración de arabinosa.

Foto de SDS-PAGE al 12%. Cinética de crecimiento a las 4 horas de inducción. Carril 1: Marcador Prestained Protein Ladder; Carril 2: arabinosa al 0.002%; Carril 3: arabinosa al 0.02%, Carril 4: arabinosa al 0.2%; Carril 5: arabinosa al 2%; Carril 6: arabinosa al 20%.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inducción, mostraron que la concentración del 2% de arabinosa, con un crecimiento bacteriano de 4 horas, era suficiente para la inducción de las proteínas. Para determinar la expresión de la proteína de interés, se realizó un análisis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes, además de una inmunodetección por Western-Blot (Figura 11). Los resultados muestran la expresión de las proteínas recombinantes de la subunidad CDT-A con un peso molecular de 31 kDa, y CDT-C con 21 kDa. Con CDT-B, la subunidad tóxica de la proteína, no se pudo inducir la expresión, aun cuando se modificaron las concentraciones de arabinosa en la curva de crecimiento.

En el ensayo de Western-Blot también se logró evaluar la expresión de las proteínas CDT-A y CDT-C, sin embargo los sueros policlonales mostraron siempre uniones inespecíficas, aun cuando fueron previamente absorbidos con la cepa de *E. coli* empleada en la expresión de proteínas. Dada esta situación se decidió

utilizar un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítipo V5, con este fue posible determinar la expresión de las proteínas CdtA y CdtC.

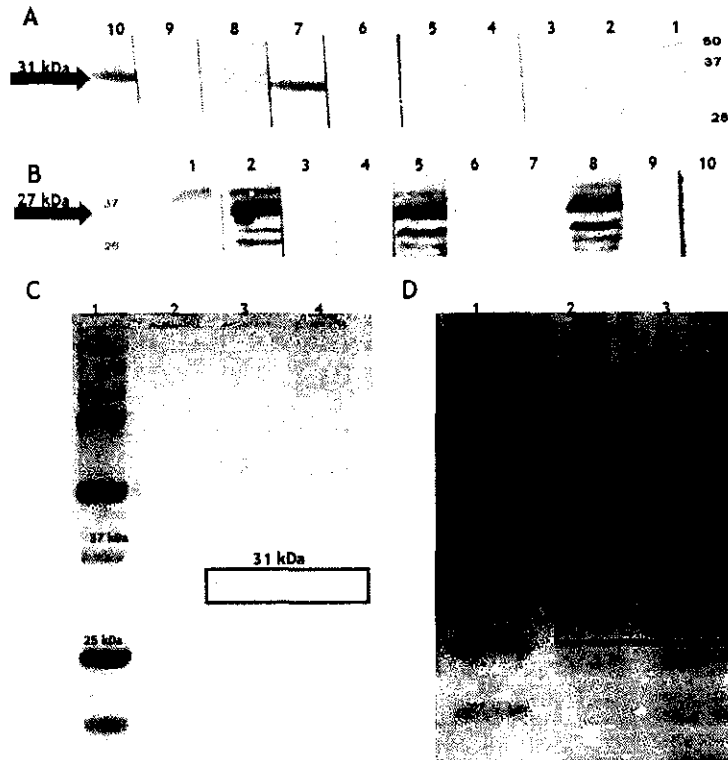


Figura 11. Inducción de Proteínas de la Toxina CDT.

A) Evaluación de la expresión de la proteína CDT-A a través de un Western-Blot. Carril:1 Marcador de peso. Carriles: 2, 3 y 4 controles negativos, proteína recombinante sin inducir. Carriles: 5 y 8 anticuerpo policlonal anti- *Campylobacter jejuni*. Carriles: 6 y 9 anticuerpo absorbido anti- *Campylobacter jejuni*. Carriles: 7 y 10 anticuerpo anti-V5. B) Evaluación de la expresión de la proteína CDT-B a través de un Western-Blot. Carril:1 Marcador de peso. Carriles: 2, 5 y 8 anticuerpo policlonal anti- *Campylobacter jejuni*. Carriles: 3, 6, y 9 anticuerpo anti-V5. Carriles: 4, 7 y 10 controles negativos, proteína recombinante sin inducir. C) Gel de poliacrilamida con condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Marcador de peso. Carril 3: CDT-A inducida con 2% de arabinosa. Carril 4: CDT-A sin inducir (control negativo). D) Gel de poliacrilamida con condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Marcador de peso. Carril 2: CDT-C sin inducir (control negativo). Carril 3: CDT-C inducido con 2% de arabinosa.

Dado que no se pudo expresar la subunidad de CDT-B de la toxina, se decidió trabajar con toxina nativa. Para ello se obtuvieron subfracciones de extractos proteicos de *C.jejuni*, los cuales se evaluaron por SDS-PAGE, los resultados obtenidos muestran la presencia de aproximadamente diez bandas cuyos pesos

moleculares estuvieron en el rango de 70 a 20 kDa. En este rango se detectaron tres bandas que corresponden a los pesos moleculares de CDT (Figura 12). Esta toxina nativa fue usada en los ensayos de infección en células HeLa, para evaluar el efecto citopático y daño a nivel de ADN causado por la toxina CDT.

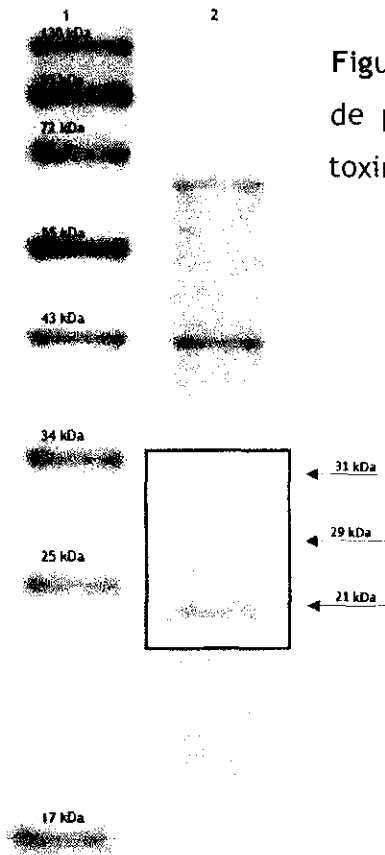


Figura 12. Foto de SDS-PAGE al 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Proteínas obtenidas del toxina nativa de *C. jejuni* cepa ATCC.

8.5 Efecto de CDT en células HeLa.

Para evaluar el efecto de CDT se utilizaron células HeLa, las cuales fueron tratadas con 150 $\mu\text{g/ml}$ de la toxina nativa de CDT durante 48 horas. Cada 24 horas, las células fueron revisadas en un microscopio invertido, para determinar daños y cambios morfológicos celulares causados por la toxina. El daño celular fue evaluado con el uso de yoduro de propidio y faloidina, estos colorantes se utilizaron respectivamente, para establecer alteraciones en el núcleo y

microfilamentos de actina. Así mismo, en estos ensayos de citotoxicidad se utilizó el fármaco etopósido, como control positivo de daño celular.

Las células HeLa tratadas con la toxina nativa de CDT, no sufrieron cambios dramáticos en la morfología macroscópica dentro de las primeras 24 h. Sin embargo, 48 horas después a la adición de la toxina, las células mostraron alargamiento, distensión del citoplasma (células completamente redondas con un diámetro mayor que las células no tratadas), fragmentación del núcleo y una distribución anormal de la cromatina (Figura 13)

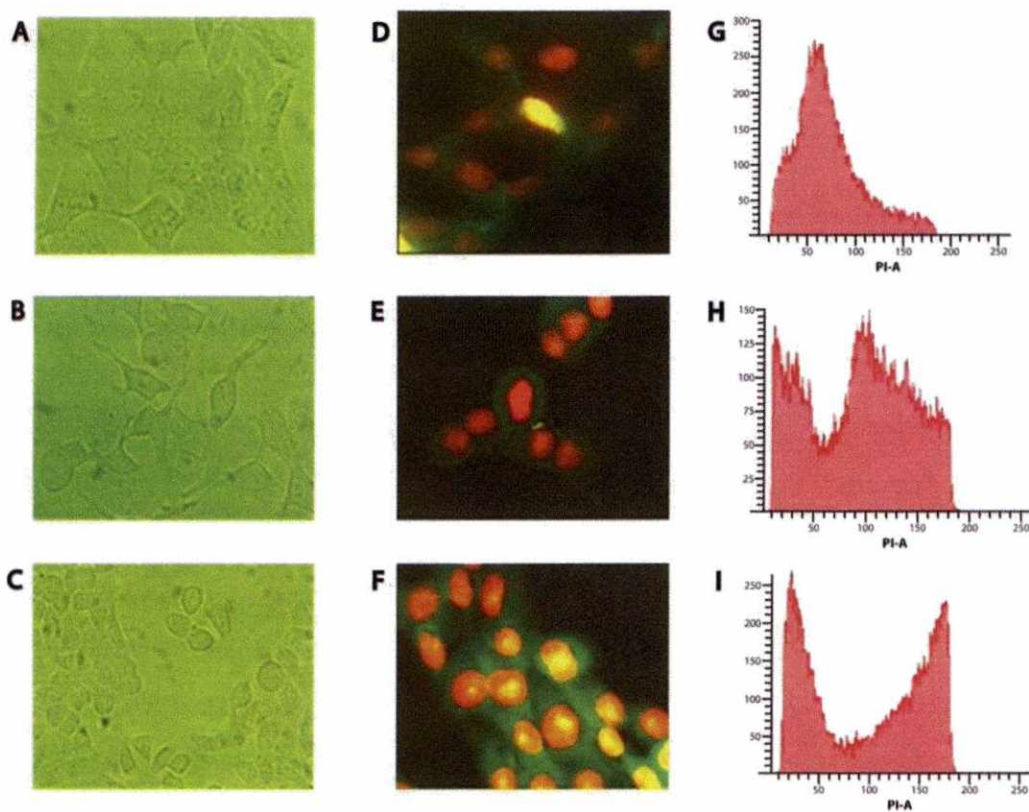


Figura 13. Efecto de la toxina nativa de CDT en células HeLa.

Estudios morfológicos de células HeLa en microscopio invertido con un aumento de 40X y arresto de la fase G2 del ciclo celular, causado por CDT y Etopósido. Paneles A,D,G: células sin tratamiento. Paneles B,E,H: células tratadas con etopósido. Paneles C,F,I: células tratadas con la toxina nativa de CDT. Paneles D,E,F: células teñidas con faloidina/yoduro de propidio. Paneles: G,H,I: análisis de citometría de flujo (porcentaje de células \pm EE, en tres experimentos independientes).

También se evaluó el efecto de la toxina en el ciclo celular por citometría de flujo (FACS). En este experimento, se midió el contenido de ADN de células sin tratamiento y de células tratadas con la toxina nativa y con etopósido. Los resultados obtenidos muestran que el 69% de las células tratadas con CDT fueron sometidas a un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular, con una acumulación mínima de ADN en la fase S. El tratamiento con etopósido indujo un 76% de bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular. Si lo comparamos con las células que no recibieron tratamiento alguno y que su ciclo celular no se vio afectado, únicamente el 18% se encontraba en la fase G2/M del ciclo. Con estos resultados podemos decir que la toxina nativa de CDT causó que las células HeLa se bloquearan en su ciclo celular de modo que no pudieran progresar más allá de la fase G2 o de la fase M temprana; comportamiento muy similar al del etopósido, fármaco utilizado para bloquear la división celular. Se ha descrito que la subunidad CDT-B tiene un efecto de DNasa ⁽³³⁾, provocando que la célula huésped muera por apoptosis; por ello se analizaron las células tratadas con la toxina nativa de CDT y se pudo apreciar que las muestras presentaron fragmentación de ADN similar a la observada en apoptosis (Figura 14), lo que corrobora la actividad citotóxica de la toxina nativa de CDT.

8.6 Actividad de Cdc2 en células tratadas con CDT.

Habiendo establecido que la toxina nativa de CDT de *C. jejuni* fue capaz de bloquear el ciclo celular en la fase G2 / M, se decidió establecer la cantidad de Cdc2, una importante cinasa reguladora del ciclo celular, la cual se asocia con la ciclina B para formar un complejo pro-mitótico, y que se acumula durante la fase S tardía y G2 en forma de Cdc2-fosforilada.

La cuantificación de Cdc2 y Cdc2-fosforilada se realizó mediante un inmunoensayo (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales. Los resultados de este análisis muestran que la cantidad de Cdc-2 fosforilado en las células

tratadas con la toxina nativa de CDT como con el etopósido fue similar, manteniéndose en altas cantidades (Figura 15). Lo que indica que debido al daño a nivel de ADN (fragmentación), las células se mantuvieron estancadas en fase G2 sin posibilidad de avanzar a la fase M.

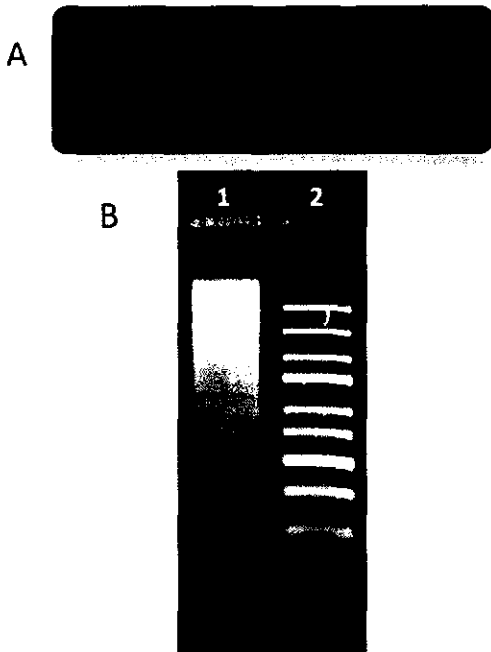


Figura 14. La toxina nativa de CDT induce fragmentación del ADN.

Las células HeLa fueron tratadas con 150 $\mu\text{g/ml}$ de la toxina nativa de CDT por 48 h y se obtuvo ADN. A) Células HeLa con alteraciones morfológicas: distensión celular, núcleo electrodenso, y fragmentación del ADN nuclear. B) Foto de un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidío. Carril 1: ADN de Células HeLa tratadas con CDT. Carril 2: Marcador de peso molecular, Gene Ruler Express DNA Ruler (Fermentas, EUA).

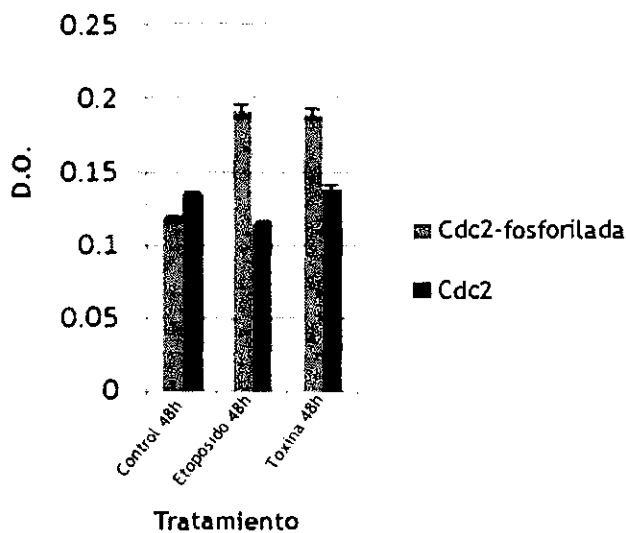


Figura 15. Determinación de Cdc2-fosforilada.

La gráfica muestra las concentraciones de Cdc2-fosforilada en células HeLa tratadas con etopósido y CDT. Los valores dados como el porcentaje de Cdc2-fosforilada \pm EE, donde $n=3$ experimentos independientes.

8.7 Efecto de Nocodazol y Latrunculina-A en la actividad citotóxica de CDT.

Una vez determinados los efectos citotóxicos de la toxina CDT en células HeLa, se evaluó la participación de los microfilamentos de actina y los microtúbulos, en el tránsito de la toxina. Para ello, las células HeLa fueron tratadas con 1 μM de latrunculina-A y/o 30 μM de nocodazol, 30 minutos antes del tratamiento con CDT. Al igual que el ensayo de tratamiento con CDT, las células HeLa fueron revisadas en un microscopio invertido cada 24 horas. En las primeras 24 horas de tratamiento, las células no mostraron alteración alguna. Para las 48 h, las células que fueron tratadas con la toxina nativa de CDT y latrunculina-A, mostraron un efecto citopático mínimo. El daño observado se basó únicamente en la elongación del citoplasma celular. Estos resultados se complementaron con el análisis del ciclo celular, donde se observó que las células tratadas con latrunculina-A, fueron capaces de disminuir un 45% del bloqueo en la fase G2 / M, en comparación con las células tratadas únicamente con CDT (Figura 16).

De forma similar, las células tratadas con la toxina nativa de CDT y nocodazol no mostraron ningún daño morfológico aparente, de hecho las células se mantuvieron replicando sin ningún problema. Estos resultados también fueron confirmados por análisis de citometría de flujo. Con sólo el 18% de las células en la fase G2 / M, similar a las células sin tratamiento y un 47% en fase S, lo que sugiere que las células fueron capaces de mantener una replicación adecuada.

Cuando se utilizaron latrunculina-A y nocodazol en tándem, los cambios morfológicos observados fueron muy similares a los observados con latrunculina-A sola. Sin embargo, en el análisis por citometría de flujo reflejó una menor cantidad de células en fase S (24%), a comparación de latrunculina-A sola (31%). Esto sugiere que a pesar de que las células fueron capaces de mantener una replicación adecuada, muchas de ellas (58%) se encuentran en fase G1, esperando la señal adecuada para seguirse replicando.

Con este experimento, se pudo demostrar que tanto latrunculina-A como nocodazol interfieren con el tránsito intracelular de toxina CDT, evitando que esta llegue al núcleo y provoque su efecto citotóxico.

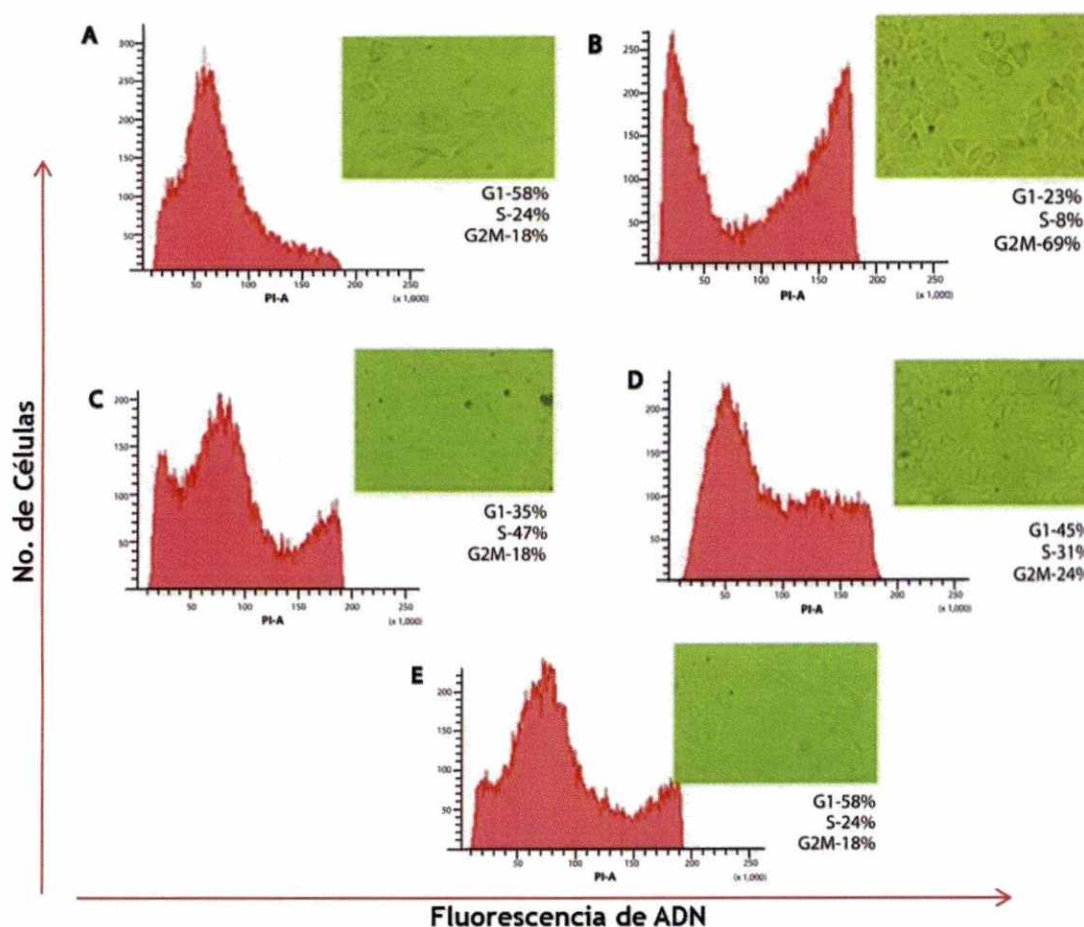


Figura 16. Análisis de Citometría de Flujo y Alteraciones Morfológicas en células HeLa tratadas con la toxina nativa de CDT e inhibidores del citoesqueleto (10,000 núcleos analizados por muestra). Panel A: Células sin tratamiento. Panel B: Células tratadas con el toxina nativa de CDT. Panel C: Células tratadas con CDT+Nocodazol. Panel D: Células tratadas con CDT+ Latrunculina-A. Panel E: Células tratadas con CDT+nocodazol+latrunculina-A.

Para establecer una relación entre los resultados obtenidos por citometría de flujo y la detección de la cinasa Cdc2, se realizó una inmunocuantificación (ELISA). Los resultados de ELISA mostraron que debido a la inhibición de microtúbulos y filamentos de actina, la toxina no fue capaz de llegar hasta el núcleo y tener su actividad de DNAsa, por lo tanto los valores de Cdc2 y Cdc2-

fosforilada se mantuvieron muy semejantes a los obtenidos con las células sin tratamiento (Figura17).

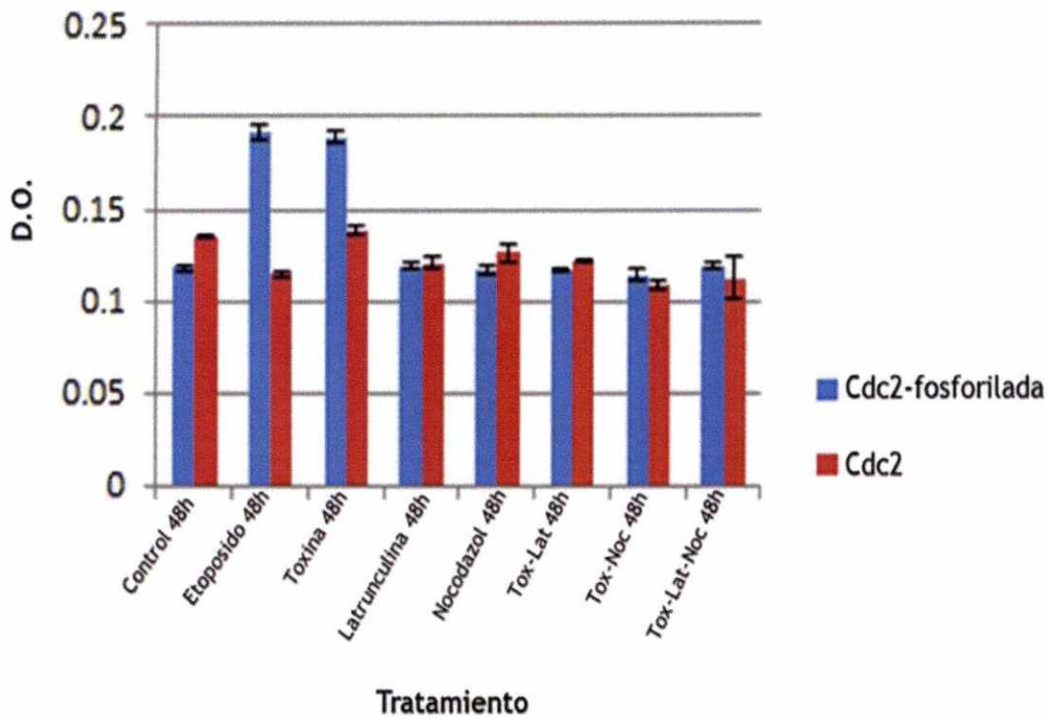


Figura 17. Determinación de Cdc2 y Cdc2-fosforilada por ELISA. La gráfica muestra las concentraciones de Cdc2 y Cdc2-fosforilada en células HeLa tratadas con CDT y los fármacos inhibidores del citoesqueleto. Los valores dados como el porcentaje de Cdc2 y Cdc2-fosforilada \pm EE, donde n=3 experimentos independientes.

9. DISCUSIÓN.

Diversas investigaciones han establecido claramente que las toxinas bacterianas funcionan como factores de virulencia. Estas toxinas tienen efectos precisos sobre diversos procesos en células eucariotas; por ejemplo, algunas interfieren con la señalización intracelular al interactuar con proteínas específicas en diferentes cascadas de señalización y otras como CDT, que interfieren en el ciclo celular ^(11,12). Sin embargo para lograr sus actividades, las toxinas tienen que alcanzar sitios específicos en la célula blanco para poder ejercer su actividad tóxica y para ello, las rutas de tránsito intracelular son indispensables. En este trabajo se muestra que la interrupción de este tránsito no permite a la toxina CDT, alcanzar su objetivo.

La toxina de distensión citoletal fue descrita por primera vez en una cepa de *Escherichia coli*, aislada de un caso de gastroenteritis pediátrica con encefalopatía. Después de haber sido identificada en *Escherichia coli*, se informó de la producción de esta toxina en otros microorganismos patógenos, tales como: *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter hepaticus*, *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, y *Campylobacter jejuni* ^(15,16). En este trabajo, evaluamos la presencia del operón *cdt* en ocho cepas: una de referencia y siete aislados. Todas las cepas mostraron la presencia del gen *cdtB* por PCR, que es la subunidad tóxica. Otros autores, como Johnson y colaboradores ⁽¹⁵⁾, también han determinado la presencia del gen *cdtB* en más de 700 cepas de *Campylobacter*, incluyendo 583 de *C. jejuni*, 109 de *C. coli*, 16 de *C. lari* y 7 de *C. fetus*. Cabe resaltar que ninguna de estas cepas fue relacionada por serotipo, biotipo o país de origen ⁽¹⁴⁾. Estos resultados sugieren que el operón *cdt* se conserva en los microorganismos del género *Campylobacter*, estos datos se correlacionan con los resultados obtenidos con el análisis de las secuencias nucleotídicas a través del método de Neighbour joining (árboles filogenéticos), además este mismo análisis demuestra que los genes que componen este operón

están altamente conservados por géneros; con excepción de *Salmonella enterica* serovar Typhi, que no codifica a homólogos aparentes de CdtA o CdtC, expresando solamente a CdtB ^(34,35).

La toxina de distensión citoletal tiene mecanismos de acción atípicos, como es la interferencia en la progresión normal del ciclo celular. Este efecto tóxico se considera exclusivo de esta toxina y es el resultado de su actividad de DNAsa, que produce daño a nivel de ADN cromosomal ^(12,18,23). No hay descritos otros componentes de *Campylobacter* que puedan tener esta actividad. Por esta razón, se optó por trabajar con la toxina nativa de CDT obtenidos de lisados de *C. jejuni*, además de que han sido utilizados en otros trabajos, además la expresión de *cdtB* en cualquier bacteria resultaría en una proteína recombinante toxica ⁽³⁰⁾.

La toxina de distensión citoletal afecta a una gran variedad de células epiteliales, incluyendo HeLa, CHO, Vero y Hep-2. Esta actividad parece ser más eficaz en cultivos de células más jóvenes con 60% de confluencia que en células maduras al 100% de confluencia ^(16,36). Esto sugiere que la actividad tóxica de CDT está estrechamente ligada al ciclo celular. Por ello, se decidió trabajar con células HeLa con un 80 % de confluencia, a las cuales antes del tratamiento con la toxina nativa de CDT, se les privó de suero fetal bovino, con el fin de sincronizar el ciclo celular y cuantificar los efectos. Los resultados observados en células HeLa tratadas con la toxina nativa de CDT fueron distensión celular, fragmentación nuclear, condensación anormal de la cromatina, detención del ciclo celular en la fase G2/M y apoptosis, lo cual es coincidente para lo reportado con estas toxinas.

La distensión celular en células HeLa se observó desde las primeras 24 h post-infección; sin embargo, no fue hasta las 48 h donde las células duplicaron y triplicaron su tamaño con respecto a las células control. La fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina también fueron eventos que se

presentaron 48 h después del tratamiento. Los núcleos fragmentados se asemejan a estructuras llamadas micronúcleos vistos en fibroblastos inyectados con proteína p13⁽⁸⁾. La semejanza entre los resultados obtenidos con el tratamiento de la toxina nativa de CDT y la perturbación originada con p13, sugieren una participación de Cdc2, dado que si no existe una activación o función normal de Cdc2, se altera el ciclo celular. Dicho de otra manera las células tratadas con CDT pueden tener alteraciones en la función de Cdc2, lo que conlleva a un bloqueo y alteración del ciclo celular que conduce a la muerte celular⁽⁸⁾. Algunas de las formas con las cuales CDT podría ocasionar que las células HeLa se bloquearan en la fase G2 del ciclo celular, serían actuando directamente sobre la Cdc2 quinasa o sobre las proteínas que interactúan directamente con Cdc2, como la fosfatasa Cdc25, que es la encargada de activar a Cdc2 para que comience la mitosis, o con Wee-1 una tirosina cinasa, la cual fosforila a Cdc2 en Tyr-15.^(8,11).

No obstante, considerando la actividad DNAasa de CDT, es muy posible que el mecanismo mediante el cual se altere ciclo celular esté relacionado con la fragmentación del ADN nuclear, por lo cual en este trabajo se comparó el efecto de CDT en las células, con el inducido por un agente prototipo que ocasiona daño en el ADN, el etopósido. Los efectos del etopósido en células HeLa ya habían sido estudiados anteriormente⁽³⁷⁾, lo que nos permitió utilizarlo y compararlo con las propiedades de la toxina nativa de CDT. Los resultados obtenidos demuestran que ambos agentes inducen un arresto en el ciclo celular, específicamente un bloqueo en la fase G2/M, con un hinchamiento progresivo de las células bloqueadas. Otros investigadores que también han utilizado preparaciones de CDT, obtuvieron resultados semejantes a los de esta investigación⁽³⁸⁾. No obstante, recientes actividades de esta toxina han sido reportadas en *A. actinomycetemcomitans*; donde se sugiere que el bloqueo del ciclo celular se produce no sólo como resultado del daño en el ADN, sino también por la actividad fosfatasa del fosfatidilinositol-3, 4, 5-Trifosfato (PIP3)⁽³⁹⁾. En *Campylobacter*, este efecto no ha sido investigado y el análisis de la secuencia

no muestra que cdtB pudiese tener esta actividad; sin embargo, se requieren de más estudios para demostrarlo.

Los resultados de citometría de flujo mostraron que las células se encontraban en diferentes fases del ciclo celular, a pesar de haber sido sincronizadas. Este fenómeno pudo deberse a una acumulación continua de algunas señales que estimulan el inicio de la fase S y por tanto pueden ser independientes de las condiciones en el medio que regulan el ciclo celular. En nuestro caso la sincronización solo se realizó con la privación de suero en el medio de cultivo. Teóricamente la privación de suero, evita que las células avancen hacia la fase S por falta de nutrientes y arrestándolas en fase G1. No obstante algunas de estas células no son arrestadas en ese momento porque tienen diferentes niveles de las señales de activación ⁽⁴⁰⁾. En los ensayos donde se evaluó el efecto de la toxina fue evidente, el mayor porcentaje de células con arresto en la fase G2, y el resto de las fases solo se presentaron en menor proporción, debido a la situación descrita anteriormente ⁽⁴⁰⁾. En los tratamientos con células HeLa sincronizadas por privación de suero, el efecto citotóxico de CDT (distensión celular, fragmentación de ADN y apoptosis) estuvo presente, lo cual indica que esta condición no afectó el mecanismo de acción de la toxina.

Considerando lo anterior, podemos decir que la toxina interfiere con una cascada de transducción que inicia en la fase S, es decir, durante la replicación del ADN. Esta cascada podría ser denominada "punto de control- DNA dañado", cuyo mecanismo es detectar ADN dañado y generar una señal que retarda la fase S, arresta las células en fase G2 y puede inducir la transcripción de genes de reparación o la apoptosis ⁽³⁶⁾.

Por otro lado, podemos asumir que cada célula tiene su propio escenario en donde el efecto de la toxina puede variar, es decir su capacidad para reparar el daño en el ADN. El estudio detallado de este escenario podría ayudar en la comprensión de la actividad tóxica de CDT.

La Subunidad B de la toxina de distensión de *C. jejuni*, tiene actividad enzimática (DNasa) y las otras subunidades (A y C), están implicadas en el reconocimiento de un receptor en la superficie celular, el cual es un gangliósido (18,41). Numerosas proteínas y lípidos en la superficie celular muestran este tipo de galactósido, lo que explicaría la gran capacidad de esta toxina para unirse a diferentes líneas celulares (41). Una vez unida a la superficie celular, la toxina por sí misma es capaz de dirigir su tráfico hacia el núcleo (41,42,43). A este respecto, se ha sugerido que la toxina podría entrar a la célula a través de endocitosis, y una vez dentro del retículo endoplásmico, se difunde al núcleo a través del poro nuclear (41,42).

Sin embargo, para el caso de CDT de *C. jejuni*, varias cuestiones siguen sin resolverse. En este trabajo se exploró el papel que juega el citoesqueleto en el tránsito de la toxina, a través de ensayos en cultivo celular y el uso de fármacos que inhiben los microtúbulos y microfilamentos de actina.

Como se observa en los resultados de los ensayos de ELISA y citometría de flujo, las células tratadas con nocodazol mostraron un menor efecto sobre la actividad de la toxina. El nocodazol es un agente farmacológico que ejerce su efecto en las células al interferir con la polimerización de los microtúbulos.

Los microtúbulos son uno de los componentes importantes del citoesqueleto, se sabe que la red dinámica de microtúbulos tiene varios papeles importantes en la célula, entre ellos, el transporte vesicular. Algunos estudios también han reportado que el nocodazol puede detener a las células en la fase G2 del ciclo celular. Sin embargo, la cantidad utilizada para lograr este efecto es alta (44).

El análisis de células tratadas únicamente con nocodazol mostró un nivel basal de arresto en la fase G2, en comparación con las células tratadas con la

combinación toxina-nocodazol, en donde el efecto desapareció. Los mismos resultados se observaron en los ensayos con latrunculina-A.

Las latrunculinas son una familia de toxinas que se unen a los monómeros de actina, impidiendo su polimerización. Este efecto produce la disrupción de los filamentos de actina del citoesqueleto ⁽⁴⁵⁾. En los ensayos de citotoxicidad, las células tratadas con la toxina nativa de CDT en combinación con latrunculina, mostraron un efecto reducido. La cantidad de Cdc2 detectadas por ELISA y el número de células en fase G2 mostró una diferencia estadística significativa entre las células tratadas con nocodazol y latrunculina A y aquellas que no recibieron tratamiento. Estos resultados demuestran una importante participación del citoesqueleto en la actividad biológica de esta toxina, específicamente en su tránsito intracelular.

Eash y Atwood ⁽⁴⁶⁾ usaron latrunculina A y nocodazol para determinar el papel de los microfilamentos y microtúbulos durante la infección viral temprana del virus BK en células Vero. Sus resultados mostraron que el desacoplamiento de la red de microtúbulos causada por nocodazol fue crucial para la entrada infecciosa del virus BK. Por el contrario, el desacoplamiento de los filamentos de actina con latrunculina A no impedía la infección por el virus.

Este fenómeno es muy similar a los resultados obtenidos con las células que fueron tratadas con CDT, nocodazol y latrunculina. Los resultados sugieren que la toxina necesita mayormente la interacción con microtúbulos en un menor grado a los filamentos de actina, esto para seguir la ruta de transporte retrógrada desde la membrana plasmática hasta el núcleo.

Finalmente, considerando que la endocitosis es importante en un gran número de funciones celulares ⁽⁴⁷⁾, no es raro que las bacterias usen este proceso celular para introducir toxinas a las células, con el fin de infectar al huésped. La regulación de las vías endocíticas está estrechamente unida a la capacidad de las

células para reconocer, responder y adaptarse a estímulos externos. Existen diferentes mecanismos endocíticos, como son: endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas (balsas lipídicas), macropinocitosis y transiciones entre endosomas, todos ellos regulados por moléculas de señalización ^(47,48). La mayoría de las proteínas de la membrana de la célula huésped se internalizan a través de endocitosis mediada por clatrina. Aunque la vía mediada por clatrininas es ubicua, la endocitosis mediada por caveolas juega un papel importante en la entrada de algunos virus sin envoltura, como son: el virus SV40 y coronavirus humano 229 ⁽⁴⁹⁾ y de algunas toxinas como es el caso de la toxina del cólera o la ricina ^(50,51). Dada la similitud estructural de la toxina de distensión citoletal con la toxina del cólera, podría suponerse que CDT de *C. jejuni* utilice la misma vía de entrada ^(50,52,53).

Teniendo en cuenta el importante papel que tienen las toxinas en la patogénesis de la campilobacteriosis y otras infecciones, todo el conocimiento generado en esta área, servirá para proponer y desarrollar nuevas estrategias para el control de patógenos.

10. CONCLUSIONES.

- 1.- Se lograron expresar las subunidades CdtA y CdtC de la toxina CDT de *Campylobacter jejuni*, sin embargo la subunidad CdtB no se logró expresar, debido a que presentó una actividad de DNAsa, lo que producía la muerte de las células transformantes.
- 2.- Se obtuvo una toxina nativa CDT de *C. jejuni*, la cual fue capaz de inducir un efecto citotóxico, dañando el ADN de las células HeLa, arrestándolas en la fase G2/M del ciclo celular.
- 3.- El uso de inhibidores de la polimerización de microtúbulos y microfilamentos de actina, alteraron el tránsito dentro de la célula, lo que ocasionó que la toxina de distensión citoletal de *C. jejuni*, no pudiese ejercer su efecto en el núcleo.
- 4.- La toxina CDT de *C. jejuni* utiliza a los microfilamentos y microfibras del citoesqueleto para su tránsito intracelular.

11. PERSPECTIVAS.

- Analizar la posible interacción directa de cdtB con proteínas reguladoras del ciclo celular.
- Establecer los mecanismos mediante los cuales cdtB se transloca hacia núcleo de las células, sitio donde podría ejercer su actividad DNAsa.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alouf J. E. (2000). Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol*, 145:1-26.
2. Hamm E. E. and Ballard J. D. (2007). Elucidating the in vivo targets of bacterial toxins. *Future Microbiol*, 2(1):85-92.
3. Lemichez E. and Barbieri J. T. (2013). General aspects and recent advances on bacterial protein toxins. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3:a013573.
4. Jamet A. and Nassif X. (2015). New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *MBio*, 6(3):e00285-15.
5. Schmitt C. K., Meysick K. C. and O'Brien A. D. (1999). Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg. Infect. Dis.*, 5(2):224-234.
6. Oswald E., Nougayrède J. P., Taieb F. and Sugai M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* 8(1):83-91.
7. Rachid A. E., Aurélie N., Thiago L., Martine D., Vasco A., Pierre L. G., Frédéric T., Gerard L., Yves L. L. and Nadia B. (2017). Heterogeneous family of cyclomodulins: smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:208-218.
8. Riabowol K., Draetta L., Brizuela D., Vandre D. and Beach D. (1989). The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell*, 57:393-401.
9. Endicott J. A. and Nurse P. (1995). The cell cycle and suc1: from structure to function? *Structure*, 3:321-325.
10. Hunter T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80:225-236.
11. Oswald E., Nougayrede J. P., Taieb F. and Sugai M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol*, 8(1):83-91.
12. Lara-Tejero M. and Galán J. E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 290(5490):354-7.
13. Amani J., Mirhosseini S. A. and Imani Fooladi A. A. (2014). A review approaches to identify enteric bacterial pathogens. *Jundishapur J Microbiol*, 8(2):e17473.
14. Young K. T., Davis L. M. and DiRita V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol*, 5:665- 679.

15. Johnson W. M. and Lior H. (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog*, 4(2):115-26.
16. Guerra L., Cortes-Bratti X., Guidi R. and Frisan T. (2011). The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins*, 3(3):172-90.
17. Cope L. D., Lumbley S., Latimer J. L., Klesney-Tait J., Stevens M. K., Johnson L. S., Purven M., Munson R. S., Lagergard T., Radolf J. D. and Hansen E.J. (1997). A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8):4056-61.
18. Nakajima T., Hirayama J., Tazumi A., Hayashi K., Tasaki E., Asakura M., Yamasaki S., Moore J. E., Millar B. C. and Matsuda M. (2012). Comparative analysis of *Campylobacter lari* cytolethal distending toxin (CDT) effect on HeLa cells. *J Basic Microbiol*, 52(5):559-65.
19. Pickett C. L., Pesci E. C., Cottle D. L., Russell G., Erdem A. N. and Zeytin H. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect Immun*, 64(6):2070-8.
20. Lara-Tejero M. and Galán J. E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun*, 69(7):4358-65.
21. Byeonghwa J., Kikui I. and Sangryeol R. (2005). Promoter analysis of cytolethal distending toxin genes (*cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*) and effect of a *luxS* mutation on CDT production in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol*, 49(7):599-603.
22. Okuda J., Kurazono H. and Takeda Y. (1995). Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb pathog*, 18(3):167-72.
23. Lara-Tejero M. and Galán J. E. (2002) Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*, 10(3):147-52.
24. Hu X. and Stebbins C. E. (2006). Dynamics and assembly of the cytolethal distending toxin. *Proteins*, 65(4):843-55.
25. Norkin L. C. and Kuksin D.(2005). The caveolae-mediated SV40 entry pathway bypasses the golgi complex in route to the endoplasmic reticulum. *Virology*, 19;2:3.
26. Margiotta A. and Bucci C. (2016). Role of intermediate filaments in vesicular traffic. *Cells*, 5(2): E20.

27. Pitcher D. G., Saunders N. A. and Owen R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*, 8:151-156.
28. Sambrook J., Fritsche E. and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual 2nded.* Cold Spring Harbor, New York; Cold Harbor Laboratory Press. USA.
29. Gruber A. and Zingales B. (1995). Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques*, 19:28-30.
30. Whitehouse C. A., Balbo P. B., Pesci E. C., Cottle D. L., Mirabito P. M. and Pickett C. L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun*, 66:1934-40.
31. Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54.
32. Matassov D., Kagan T., Leblanc J., Sikorska M. and Zakeri Z. (2004). Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. *Methods Mol Biol*, 282:1-17.
33. Elwell C. A. and Dreyfus L. A. (2000). DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol*, 37:952-63.
34. Haghjoo E. and Galan J. E. (2004). *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(13):4614-9.
35. Hu X., Nestic D. and Stebbins C. (2006). Comparative structure-function analysis of cytolethal distending toxins. *Proteins*, 62(2):421-34.
36. Bezine E., Vignard J. and Mirey G. (2014). The cytolethal distending toxin effects on mammalian cells: a DNA damage perspective. *Cells*, 3(2):592-615.
37. Lock R. B., Galperina O. V., Feldhoff R. C. and Rhodes L. J. (1994). Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res*, 54(18):4933-9.
38. De Rycke J. and Oswald E. (2001). Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? *FEMS Microbiol Lett*, 203(2):141-8.
39. Shenker B., Walker L., Zekavat A., Dlakic M. and Boesze-Battaglia K. (2014). Blockade of the PI-3K signalling pathway by the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin induces macrophages

- to synthesize and secrete pro-inflammatory cytokines. *Cell Microbiol*, 16(9):1391-404.
40. Buder-Hoffmann S., Palmer C., Vacek P., Taatjes D. and Mossman B. (2001). Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(4):405-13.
 41. Thelestam M. and Frisan T. (2004). Cytolethal distending toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 152:111-33.
 42. Smith J. L. and Bayles D. O. (2006). The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Crit Rev Microbiol*, 32(4):227-48.
 43. Young V. B., Knox K. A. and Schauer D. B. (2000). Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun*, 68(1):184-91.
 44. Ho Y. S., Duh J. S., Jeng J. H., Wang Y. J., Liang Y. C., Lin C. H., et al. (2001). Griseofulvin potentiates antitumorigenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer*, 91(3):393-401.
 45. Braet F., De Zanger R., Jans D., Spector I. and Wisse E. (1996). Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B. *Hepatology*, 24(3):627-35.
 46. Eash S. and Atwood W. (2005). Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol*, 79(18):11734-41.
 47. Doherty G. J. and McMahon H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 78:857-902.
 48. Quest A. F., Leyton L. and Parraga M. (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol*, 82(1):129-44.
 49. Thorley J. A., McKeating J. A. and Rappoport J. Z. (2010). Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma*, 244(1-4):15-24.
 50. Hansen G. H., Dalskov S. M., Rasmussen C. R., Immerdal L., Niels-Christiansen L. L. and Danielsen E. M. (2005). Cholera toxin entry into pig enterocytes occurs via a lipid raft- and clathrin-dependent mechanism. *Biochemistry*, 44(3):873-82.

51. Herrera C., Klokk T. I., Cole R., Sandvig K., and Mantis N. J. (2016). A bispecific antibody promotes aggregation of ricin toxin on cell surfaces and alters dynamics of toxin internalization and trafficking. *PLoS One*, 14; 11(6):e0156893.
52. Saslowsky D. E., Te Welscher Y. M., Chinnapen D. J., Wagner J. S., Wan J., Kern E., et al. (2013). Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure of the ceramide domain. *J Biol Chem*, 288(36):25804-9.
53. Young K. T., Davis L. M. and Dirita V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 5(9):665-79.

14. ANEXOS.

TABLAS.

Tabla 1. Lista de iniciadores, secuencias, tamaño de los amplicones y condiciones para la PCR.

Iniciadores	Secuencias	Tamaño del Amplicón	Condiciones de la PCR
<i>Gen cdtA</i>	cytA1: 5'-TGCAAAAAATTATAGTTTTATTTATGTTG-3' cytA2: 5'-TCGTACCTCTCCTTGGCG-3'	807 pb	94°C 1 min 62°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
<i>Gen cdtB</i>	cytB1: 5'-ATGAAAAAATTATATGTTTATTTTATC-3' cytB2: 5'-TTTTCTAAAATTTACTGGAAAATG -3'	781pb	94°C 1 min 55°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
<i>Gen cdtC</i>	cyt C1: 5'-ATGAAAAAATTATTACTTTGTTTTTATG-3' cytC2: 5'-TTCTAAAGGGGTAGCAGCTG-3'	570 pb	94°C 1 min 57°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)

*Todos los iniciadores fueron diseñados para esta tesis.

Tabla 2. Lista de iniciadores, secuencias, tamaño de los amplicones y condiciones para la PCR .

Iniciadores	Secuencias	Tamaño del Amplicón	Condiciones de la PCR
<i>Gen cdtA</i> Fw-Dirección	cytA1: 5'-TGCAAAAAATTATAGTTTTATTTATGTTG-3' Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	XXX Dirección incorrecta	94°C 1 min 62°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
<i>Gen cdtA</i> Fw-Dirección	cytA2: 5'-TCGTACCTCTCCTTGGCG-3' Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	807 pb Dirección correcta	94°C 1 min 62°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
<i>Gen cdtB</i> Fw-Dirección	cytB1: 5'-ATGAAAAAATTATATGTTTATTTTATC-3' Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	XXX Dirección incorrecta	94°C 1 min 55°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
<i>Gen cdtB</i>	cytB2: 5'-TTTTCTAAAATTTACTGGAAAATG -3'	781pb	94°C 1 min 55°C 1 min

Fw-Dirección	Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	Dirección correcta	72°C 1 min (30 ciclos)
Gen <i>cdtC</i> Fw-Dirección	cyt C1: 5'-ATGAAAAAATTATTACTTTGTTTTTATG-3' Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	XXX Dirección incorrecta	94°C 1 min 57°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)
Gen <i>cdtC</i> Fw-Dirección	cytC2: 5'-TTCTAAAGGGGTAGCAGCTG-3' Fw-dirección: 5'-ATGGGCTCTGGATCCG-3'	570 pb Dirección correcta	94°C 1 min 57°C 1 min 72°C 1 min (30 ciclos)

*Todos los iniciadores fueron diseñados para esta tesis.

Tabla 3. Lista de anticuerpos empleados y sus diluciones.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Proveedor
Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> Absorbido	Conejo	1:500	Elaborado en esta tesis
Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> Sin absorber	Conejo	1:500	Elaborado en esta tesis
Anti- V5-HRP	Ratón	1:5000	Invitrogen, EUA
Anti-Conejo	Cabra	1:1000	Santa Cruz, EUA
Anti- Cabra-HRP	Burro	1:1000	Santa Cruz, EUA

Tabla 4. Esquema de Inmunización para la obtención de antisuero policlonal.

SEMANA	ACTIVIDAD	MUESTREO
0	Obtención del suero pre-inmune	5ml de suero
1	Primera inoculación subcutánea 2mg del antígeno/2ml de Sol. Salina Fisiológica (SSF) esteril	-----
3	1ª dosis de refuerzo subcutánea 2mg del antígeno/2ml de carbopol	-----
5	2ª dosis de refuerzo subcutánea 2mg del antígeno/2ml de carbopol	-----
7	3ª dosis de refuerzo subcutánea 2mg del antígeno/2ml de carbopol	-----
9	4ª dosis de refuerzo subcutánea 2mg del antígeno/2ml de carbopol	-----
11	5ª dosis de refuerzo subcutánea 2mg del antígeno/2ml de carbopol	-----
12	Sangría final	50 ml de suero

Tabla 5. Corte con enzimas de restricción de las subunidades CDT.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	PRODUCTO AMPLIFICADO	SITIOS DE CORTE	FRAGMENTOS GENERADOS
<i>Sau3A</i>	<i>cdtA</i> 807 pb	3	120,149, 466 y 807 pb
	<i>cdtB</i> 791 pb	2	184, 564 y 791 pb
	<i>cdtC</i> 570 pb	1	147, y 156 pb
<i>EcoRI</i>	<i>cdtB</i> 791 pb	1	379 y 419 pb
<i>HindIII</i>	<i>cdtC</i> 570 pb	1	471 y 570 pb
	<i>cdtA</i> 807 pb	2	293, 514 y 807 pb
<i>DraI</i>	<i>cdtA</i> 807 pb	4	128,157,411,696 y 807 pb
<i>EcoRV</i>	<i>cdtB</i> 791 pb	1	162 y 636 pb

ARTÍCULO.

Cytolethal Distending Toxin From *Campylobacter jejuni* Requires the Cytoskeleton for Toxic Activity

Estela T. Méndez-Olvera,^{1†} Jaime A. Bustos-Martínez,² Yolanda López-Vidal,³ Antonio

Verdugo-Rodríguez,⁴ and Daniel Martínez-Gómez^{5*}

¹Departamento de Producción Agrícola y Animal, and Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México City, México; ²Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México City, México; ³Departamento de Microbiología e Inmunología-Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México; ⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México City, México; ⁵Corresponding author: Estela T. Méndez-Olvera, Departamento de Producción Agrícola y Animal, and Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México City, México. E-mail: emendez@correo.xoc.uam.mx

Received 2015 December 23; Revised 2016 September 05; Accepted 2016 September 05.

Abstract
Background: *Campylobacter jejuni* is one of the major causes of infectious diarrhea worldwide. The distending cytolethal toxin (CDT) of *Campylobacter* spp. interferes with normal cell cycle progression. This toxic effect is considered a result of DNase activity that produces chromosomal DNA damage. To perform this event, the toxin must be endocytosed and translocated to the nucleus. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the role of the cytoskeleton in the translocation of CDT to the nucleus. **Methods:** *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 and seven isolates donated from Instituto de Biotecnología were used in this study. The presence of CDT genes in *C. jejuni* strains was determined by PCR. To evaluate the effect of CDT, HeLa cells were treated with bacterial lysate, and the damage and morphological changes were analyzed by microscopy, immunofluorescence staining, and flow cytometry. To evaluate the role of the cytoskeleton, HeLa cells were treated with either latrunculin A or by nocodazole and analyzed by microscopy, flow cytometry, and immunoenzymatic (ELISA). **Results:** The results obtained showed that the eight strains of *C. jejuni*, including the reference strain, had the ability to produce the toxin. Usage of latrunculin A and nocodazole, two cytoskeletal inhibitors, blocked the toxic effect in cells treated with the toxin. This phenomenon was evident in flow cytometry analysis and immunoenzymatic detection of Cdc2-p-hosphorylated. **Conclusions:** This work showed that the cytotoxic activity of the *C. jejuni* CDT is dependent on its endocytosis. The alteration in the microtubules and actin filaments caused a blockage transit of the toxin, preventing it from reaching the nucleus of the cell, as well as preventing DNA fragmentation and alteration of the cell cycle. The CDT toxin appears to be an important element for the pathogenesis of campylobacteriosis, since all clinical isolates showed the presence of *cdtA*, *cdtB* and *cdtC* genes.
Keywords: Cdc2 Protein Kinase, Cytolethal Distending Toxin, Cytoskeleton, Latrunculin A, Nocodazole, *Campylobacter jejuni*

1. Background

Campylobacter jejuni is one of the most common causative agents of foodborne infectious illness in humans. A bacterial membrane-associated protein, this cytolethal distending toxin (CDT) has been identified as one of the virulence factors required for the pathogenesis of *C. jejuni* (1, 2). Cytolethal distending toxin is a tripartite protein toxin composed of three subunits, CdtA, CdtB, and CdtC, encoded by an operon comprising *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*. Several bacterial species have been identified that contain CDT, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (4), *Campylobacter* sp. (5), *Escherichia coli* (6), *Haemophilus ducreyi* (7), *Helicobacter* sp. (8), *Shigella dysenteriae* (9), and *Salmonella enterica* (10). Cytolethal distending toxin holotoxin functions as an "AB₂" toxin, in which CdtB is the active toxic unit "A" of the AB₂ toxin. CdtA and CdtC make up the "B₂" units required for CDT binding to target cells and for the delivery of CdtB into the cell interior (3, 11, 12). The nature of the surface receptor is still poorly characterized. However, the binding of CDT requires intact lipid rafts, where CdtA and CdtC can interact with the cell membrane and enable the translocation of the holotoxin across the cell membrane (13-15). The toxin is retrograde transported into the nuclear compartment, where the CdtB subunit exhibits type I DNase activity. Cellular intoxication induces DNA damage and activation of the DNA damage response, which results in arrest of the target cells in the G1 and/or G2 phases of the

HeLa cells were grown in Eagle's minimal essential medium with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1% Na-bicarbonate, and 0.1 mM sodium pyruvate (all reagents from Gibco, USA). For CDT treatment, 5×10^4 cells were seeded in tissue culture plates (Nunc, Denmark) with MEM medium and 150 μ g/ml of toxin. Cells were examined under an inverted microscope (Velab, Mex) every 24 hours for observation of morphologic changes or damage. As a DNA damage positive control, we used 50 mM Etoposide (VP-16-Lemery, Mex) (30, 31). For the inhibition of translocation of toxin, HeLa cells were treated with either 1 μ M latrunculin A (Sigma-Aldrich, USA) or by addition of 30 μ M of nocodazole (Sigma-Aldrich, USA). The drugs were present for 30 minutes prior to the CDT infection assay.

3.4. Cell Culture and CDT Treatment

Standard immunofluorescence staining and visualization under a confocal epifluorescence microscope (E800, Nikon, Japan) was performed to assess morphologic patterns of cells. Cells were cultured on chamber slides (Nalge, USA) and incubated with the CDT preparation for 48 hours at 37°C, in an atmosphere of 5% CO₂. They were then washed with PBS and fixed for 15 minutes with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature. Fluorescent phalloidin (200 U/ml; Alexa 488, Molecular Probes, USA) was then added to detect actin microfilaments. After 30 minutes of incubation with phalloidin, cells were washed in PBS before propidium iodide (Sigma, USA) staining and microscopic examination (32).

3.5. Fluorescence

HeLa cells treated with CDT preparation, as described above, were processed for evaluation of DNA fragmentation. Extracted DNA from lysed cells was dissolved in 10 μ L distilled water and treated with RNase A (Thermo Scientific, USA) 10 μ g/ml at 37°C for 45 minutes and electrophoresed on a 1.2% agarose gel containing 0.5 μ g of ethidium bromide per mL DNA fragments were visualized under UV transillumination (Gel Doc XR, BioRad, USA). Cells exposed to 50mM of etoposide were used as a positive control.

3.6. Measurement of DNA Fragmentation

HeLa cells with CDT treatment, with or without latrunculin A and nocodazole were washed twice with PBS. Cells were resuspended and lysed for five minutes at 4°C in RPA buffer (1% [v/v] Triton X-100, 1% [v/v] sodium deoxycholate, 0.1% [v/v] sodium dodecyl sulfate [SDS], 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA in distilled water) (Thermo Scientific, USA) and supplemented

3.7. Immunoprecipitation of Cdc2-Phosphorylated

HeLa cells with CDT treatment, with or without latrunculin A and nocodazole were washed twice with PBS. Cells were resuspended and lysed for five minutes at 4°C in RPA buffer (1% [v/v] Triton X-100, 1% [v/v] sodium deoxycholate, 0.1% [v/v] sodium dodecyl sulfate [SDS], 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1 mM EDTA in distilled water) (Thermo Scientific, USA) and supplemented

cell cycle and activation of DNA repair mechanisms, cellular distention and nuclear enlargement, and Cdc2 and ataxia-telangiectasia-mutated protein (ATM) phosphorylation. Cells that fail to repair the damage will senesce or undergo apoptosis (11, 16-20). Some bacterial protein toxin internalization had typically been observed to involve rearrangement of the host cytoskeletal structure, resulting in endocytosis (21-23). This internalization can occur through multiple routes, including clathrin-dependent endocytosis, caveolae, phagocytosis, macropinocytosis, and several other clathrin-independent pathways (24). Actin and tubulin have particularly well-characterized roles during internalization: actin, which is composed of microfilaments (MFs), has a clear role in generating force to assist uptake, while tubulin microtubules (MTs) are involved in the transport of endocytic vesicles (25). However, some questions remain regarding the internalization pathway and the role of microfilaments and microtubules in the intracellular trafficking of CDT. Latrunculin A, a disruptor of actin microfilament organization, and nocodazole, a disruptor of microtubules, both have been widely used in assays of vesicular traffic (26).

2. Objectives

The aim of this study was to evaluate the role of the cytoskeleton in the translocation of CDT to the nucleus.

3. Methods

3.1. Bacterial Culture

Campylobacter jejuni ATCC 33291 and seven isolates donated from Instituto de Biotecnología, UNAM were used in this study. All strains were grown on *Campylobacter* blood-free selective agar base (Oxoid, USA), with 5% sheep's whole blood, under microaerophilic conditions (5% O₂, and 10% CO₂) at 37°C for 24 - 48 hours.

3.2. Detection of cdt Genes From *Campylobacter jejuni*

The presence of CDT genes in *Campylobacter* strains was determined by PCR. The sequences of all *cdt* gene primers (IDT, USA), sizes of PCR amplicons, and PCR conditions used in this study are presented in Table 1.

3.3. CDT Preparations

Cytolocal distending toxin preparations were obtained as described previously by Whitehouse (27). The preparations applied in all assays were evaluated by SDS-PAGE (28) and quantified by Bradford (29).

Having evaluated the cytotoxic effects of CDT toxin in HeLa cells, we determined whether actin microfilaments and microtubules were involved in the transit of the toxin. To do this, HeLa cells were treated with 1 μ M latrunculin A or 30 μ M nocodazole, 30 minutes before CDT treatment. As in the previous experiment, HeLa cells were viewed on an inverted microscope every 24 hours. In the first 24 hours (Figure 4), cells that were treated with the CDT toxin and latrunculin showed minimal cytopathic

4.4. Effect of Nocodazole and Latrunculin A on the Toxic Activity of CDT

ure 3).

the S phase, and 76% of those treated with etoposide were also blocked in the G2/M phase of the cell cycle, while only 18% of untreated cells showed a blockage at the G2/M and a high proportion of cells in the S phase. Having established that the CDT toxin from *C. jejuni* was able to block the cell cycle in the G2/M phase, the amount of phosphorylated Cdc2 in these cells was evaluated, because this cyclin is essential to the regulation of the cell cycle. Quantitation was performed in an immunoassay (ELISA) using monoclonal antibodies and protein extract from cells treated with toxin and etoposide. The results of this analysis show that the amount of phosphorylated Cdc-2 in toxin-treated cells was similar to that of cells treated with etoposide (Fig-

Morphological studies by inverted microscope at actual magnification 40 \times and G2 arrest in HeLa cells by CDT and etoposide. Panel A, D and G cells without treatment; Panel B, E and H cells treated with etoposide; Panel C, F and I cells treated with CDT. Panels D, E, and F, cells stained with phalloidin/propidium iodide; Panels G, H, and I, flow cytometry analysis (percentage of cells \pm SE, in three independent experiments).

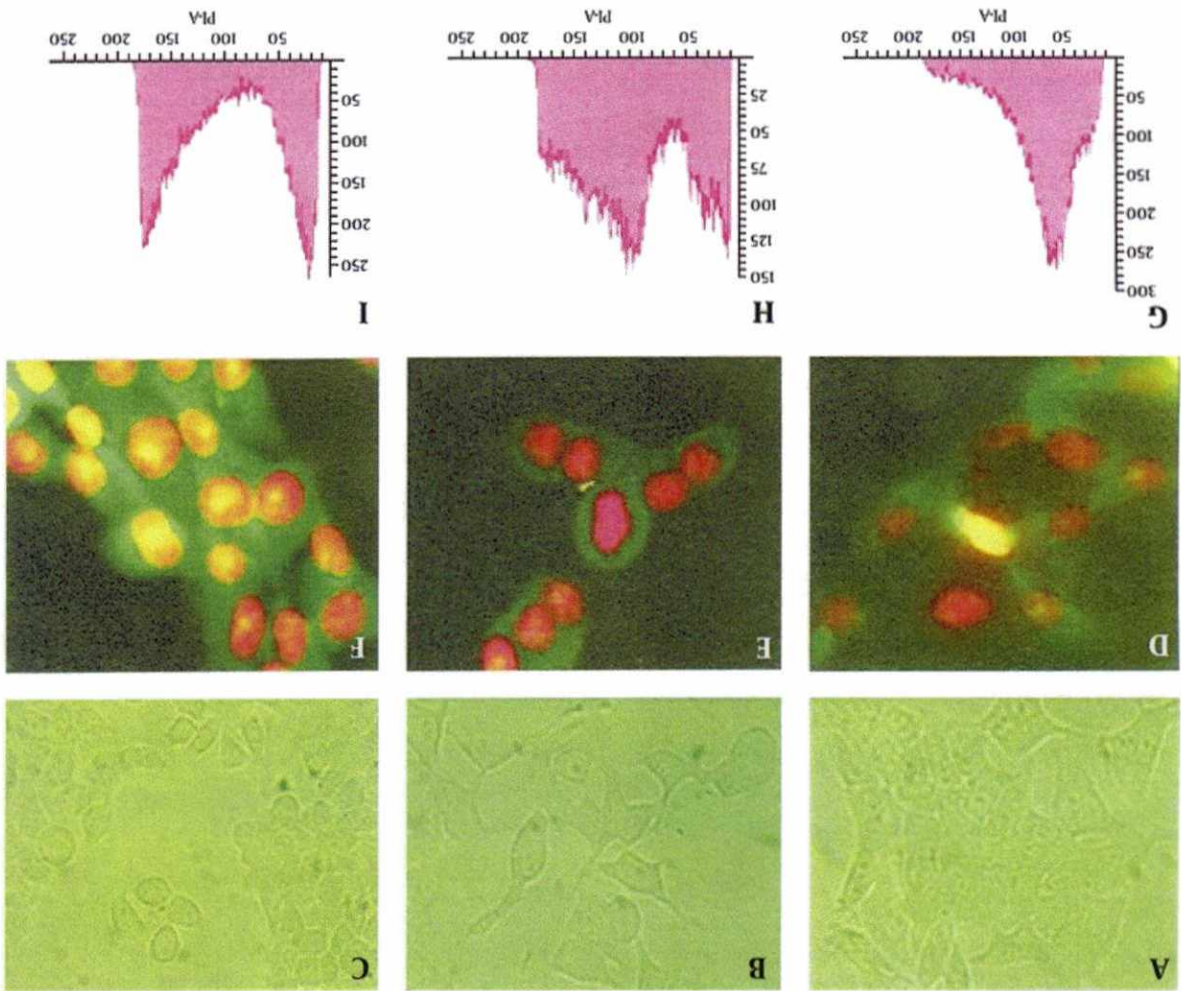


Figure 1. CDT and Etoposide Produce Similar Effects in HeLa Cells

damage, based on the elongation of the cell cytoplasm. In cell cycle analysis, latrunculin was able to decrease 45% of blocked cells in the G2/M phase, compared with toxin treated cells only. Similarly, cells treated with CDT and nocodazole showed no apparent morphological damage. This was also confirmed by the results of FACS analysis, with only 18% of cells in the G2/M phase, similar to the untreated cells (Figure 4).

When latrunculin and nocodazole were used in tandem, the morphological changes observed were very similar to those seen with latrunculin alone. However, an apparent 5 phase of the cell cycle was noted in FACS analysis (Figure 4). This suggests that the cells were able to

Figure 2. CDT Induces DNA Fragmentation. Hela cells were subjected to 150 µg/ml of CDT preparation for 24 hours, after DNA was obtained and visualized by electrophoresis, in 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA obtained from Hela cells with CDT treatment; lane 2, Gene Ruler Express DNA Ladder (Fermentas, USA).

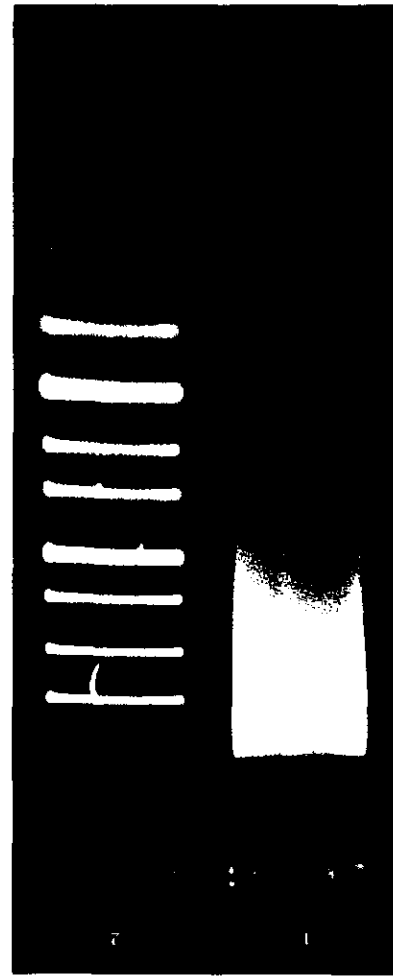


Figure 2. CDT Induces DNA Fragmentation

The CDT was first described in one strain of *Escherichia coli*, isolated from a pediatric case of gastroenteritis with encephalopathy. After identification in *E. coli*, CDT production was also reported in other pathogen microorganisms, such as *S. dysenteriae*, *H. hepaticus*, *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans*, and *C. jejuni* (11). In this work, we evaluated the presence of the *cdt* gene in eight strains: one reference and seven isolated. All strains showed by PCR test the presence of the *cdtB* gene, which is the toxic subunit.

Many investigations have clearly established that bacterial toxins function as virulence factors. These toxins have precise effects on different processes in eukaryotic cells; for example, some interfere with intracellular signaling by interacting with specific proteins in different signaling cascades and others, such as CDT, interfere in the cell cycle (36-38). For these activities, toxins have to reach specific places in the cell, using the normal routes of intracellular transit. This paper explores the role of the cytoskeleton in the biological activity of CDT through different assays in which pharmacological inhibitors were added to cell cultures treated with the CDT of *C. jejuni*.

5. Discussion

maintain adequate replication. With this experiment, we were able to show that both latrunculin and nocodazole interfere with intracellular transit of CDT toxin. Besides, the ELISA results showed that the amount of phosphorylated Cdc2 in Hela cells treated with CDT toxin and with cytoskeleton inhibitors (i.e., latrunculin and nocodazole) were lower than in cells treated with CDT and eroposide (Figure 3).

The graphics show variations in the concentration of Cdc2^P measured in samples with different treatments. Values are given as the percentage of Cdc2^P ± SE, where n = 3 independent experiments.

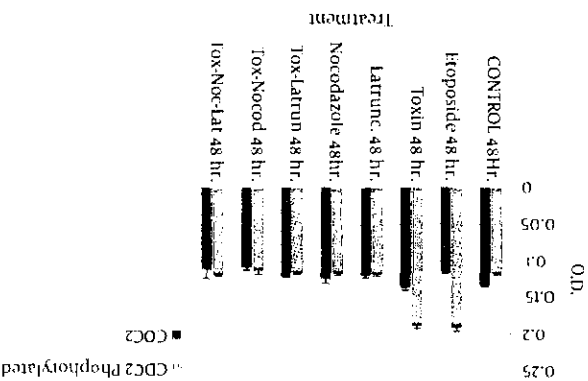


Figure 3. Determination of Cdc2^P by Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Other authors, such as Johnson et al. (5), have also reported the presence of the *cdtB* gene, working with more than 700 strains of *Campylobacter*, including 583 of *C. jejuni*, 109 of *C. coli*, 16 of *C. lari*, and 7 of *C. fetus*. None of these strains was correlated by serotype, biotype, or country of origin (5). These results suggest that the *cdt* operon is conserved in microorganisms of the *Campylobacter* genus, at least in the *C. jejuni* species. This conservation does not occur in the *Salmonella enterica* serovar Typhi, which does cur in the *Salmonella enterica* serovar Typhi, which does

The distending cytolithal toxins have unusual mechanisms of action: the interference with normal cell cycle progression. This toxic effect is considered to be exclusive to this toxin, and it is a result of DNase activity that produces chromosomal DNA damage (2, 12). No other components of the *Campylobacter* bacteria cell have this activity. For this reason, CDT preparations obtained from bac-

not encode apparent homologs of CdtA or CdtC, only expressing *cdtB* (10).

Flow cytometry analysis and morphological alterations in HeLa cells treatment with cytoskeletal inhibitors and CDT (10,000 nuclei were analyzed by sample). Panel A, cells without treatment; Panel B, cells treated with CDT; Panel C, cells treated with CDT + nocodazole; Panel D, cells treated with CDT + latrunculin A; Panel E, cells treated with CDT + nocodazole + latrunculin A.

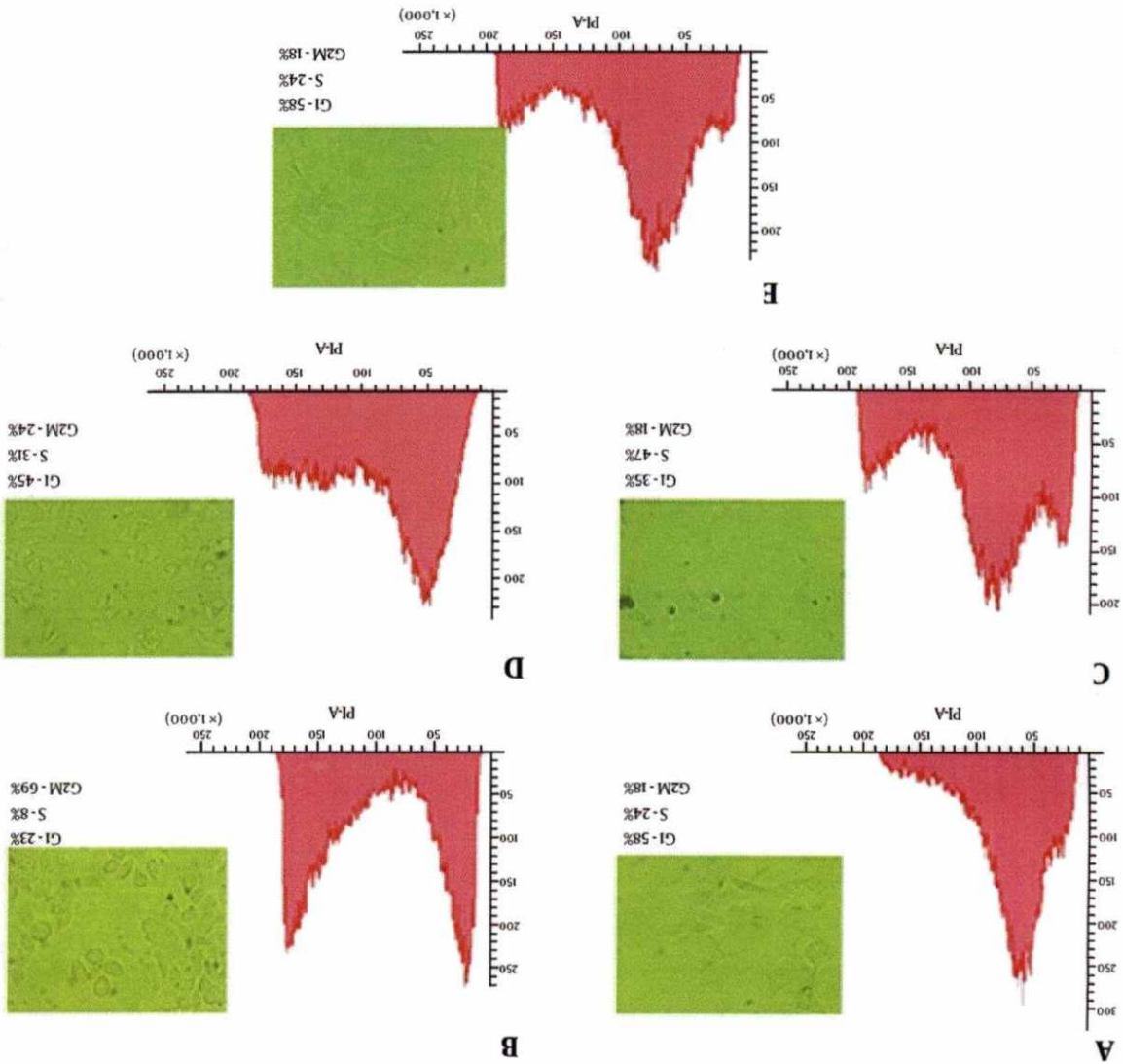


Figure 4. Latrunculin A and Nocodazole Affect CDT Activity in HeLa Cells

We are grateful to Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Xochimilco throughout this process and

Acknowledgments

of pathogens. serve to propose and develop new strategies for the control other infections, all knowledge generated in this area will ins have in the pathogenesis of campylobacteriosis and COP-II proteins. Considering the important role that toxin molecules might be involved in this route, as SNAREs and a lower participation of actin filaments. However, other important in the retrograde transport route of CDT, with cell nucleus. Polymerization of microtubules might be the cytoskeleton to move into the cell in order to reach the In conclusion, this work showed that C. jejuni CDT uses may be involved in the entry of the C. jejuni CDT (50, 51).

rural similarity of the CDT and cholera toxin, this pathway such as the SV40 virus and cholera toxin. Given the structure of the endoplasmic reticulum, toxins use this route to reach the endoplasmic reticulum, ingolipid and serum components (46). Some viruses or anchored proteins, and transcytotic transport of glycosph- homeostasis, recycling of glycosylphosphatidylinositol- sis mediated by caveolae, which is involved in cholesterol- gions known as lipid rafts, is the process called endocyt- endocytosis of extracellular particles, associated with re- endocytosis for extracellular ligands and the plasma mem- brane, another alternate route that is actively involved in While clathrin-mediated endocytosis is the main route of endosomes, are regulated by signaling molecules (24, 46). cytosol/rafts, macropinosytosis, and transitions between clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endo- nal stimuli. Different endocytic mechanisms, including ability of cells to recognize, respond, and adapt to exte- tion of endocytic pathways is closely coupled with the ins into cells, in order to infect the host. The regula- a great number of cellular functions (24). It is not rare Finally, considering that endocytosis is important in from the plasma membrane to the nucleus.

large degree of the microtubules in a lower percentage the truncculin. Our results suggest that the toxin needs in a obtained, when cells were treated with nocodazole and la- actin filaments with latruncculin A did not impede BKV in- the BKV infectious entry. In contrast, disassembly of the croutubule network caused by nocodazole was crucial for cells. Their results showed that the disassembly of the mi- crotubules during early viral infection of BK virus in Vero dazole to determine the role of microfilaments and mi-

1. Young KT, Davis LM, Dittia VJ. Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(9):665-79. doi: 10.1038/nrmicro1718. [PubMed: 17703225].
2. Pfkert CL, Pesci EC, Cortie DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H, Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. cdtB gene. *Infect Immun*. 1996;64(6):2070-8. [PubMed: 8675309].
3. Lara-Iglesias M, Galan JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun*. 2001;69(7):4358-65. doi: 10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001. [PubMed: 11401974].
4. Sugai M, Kawamoto T, Perez SY, Ueno Y, Komatsu S, Ueda H, Fujiwara T, et al. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetecomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun*. 1998;66(10):5008-19. [PubMed: 9746611].
5. Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog*. 1988;4(2):115-26. [PubMed: 284928].
6. Perez SY, Marches O, Baigie F, Nougayrede JP, Herault F, Jasca C, et al. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks Hela cell division in G2/M phase. *Mol Microbiol*. 1997;24(5):1095-107. [PubMed: 9220015].
7. Cope LD, Lumbley S, Latimer JL, Klesney-Tait J, Stevens MK, Johnson LS, et al. A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4056-61. [PubMed: 9108104].
8. Young VB, Knox KA, Schauer DB. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun*. 2000;68(1):184-91. [PubMed: 10603386].
9. Okuda J, Kurazono H, Takeeda Y. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (cdtA) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the cdt gene from *Shigella dysenteriae*. *Mol Cell Pathog*. 1995;18(3):167-72. [PubMed: 7565011].
10. Haghtoo E, Galan JE. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4614-9. doi: 10.1073/pnas.0400932101. [PubMed: 15070766].

References

- cia y Tecnología, México (CONACYT-9696D).
Acuerdos del Rector 2007 and by Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, México (CONACYT-9696D).
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco-
Fundingsupport: This work was supported by Uni-
lthors read and approved the final manuscript.
to critical revision of the manuscript, study supervision,
López-Vidal, and Antonio Verdugo-Rodríguez contributed
and material support. Jaime A. Bustos-Martínez, Yolanda
manuscript, study supervision, administrative, technical,
to the analysis, interpretation, critical revision of the
the manuscript. Daniel Martínez-Gómez contributed
ysis, interpretation, critical revision, and drafting of
tributed to the study plan, design, acquisition, anal-
Authors' Contribution: Estela T. Méndez-Olvera con-

Footnotes

to Dr. Edith Cortés Barberena for her advice on flow cytom-

- cer cells. *Int J Concer* 2001;91(3):393-401. [PubMed: 1169965].
49. Braet F, De Zanger R, Jans D, Spector I, Wisse E. Microfilament-disrupting agent latrunculin A induces and increased number of fenestrae in rat liver sinusoidal endothelial cells: comparison with cytochalasin B. *Hepatology*. 1996;24(3):627-35. doi: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008781335. [PubMed: 8781335].
50. Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components of the ceramide domain. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25804-9. doi: 10.1074/jbc.M113.474957. [PubMed: 23884419].
51. Saslowsky DE, te Weischer VM, Chinapen DJ, Wagner JS, Wan J, Kern E, et al. Ganglioside GM1-mediated transcytosis of cholera toxin bypasses the retrograde pathway and depends on the structure in BK virus infectious entry. *J Virol*. 2005;79(18):11734-41. doi: 10.1128/JVI.79.18.11734-11741.2005. [PubMed: 16140751].