

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LAS VARIACIONES EN LOS DOMINIOS  
DE UNIÓN A RECEPTOR DE TOXINA B DE CEPAS CLÁSICAS E  
HIPERVIRULENTAS DE *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de  
Posgrado en Maestría en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e  
Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología  
con énfasis en bacteriología.

AMANDA VILLALOBOS JIMÉNEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

## **Dedicatoria**

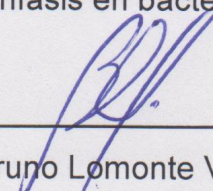
A mis papás y a Leo, gracias por todo su amor y apoyo a lo largo de mi vida. A Karol y Susana por ser las mejores amigas y compañeras, por todo el apoyo y buenos recuerdos que me llevo de la maestría.

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, particularmente al Centro Investigación en Enfermedades Tropicales y en especial a mi comité asesor: Esteban Chaves, Carlos Chacón y Carlos Quesada por sus invaluable enseñanzas, paciencia y disposición para este proyecto.

También gracias a Danilo, Erick, Cesar, Pamela, Adriana, Mariel, Yeimy, John y Marlen, por toda la ayuda que me brindaron.

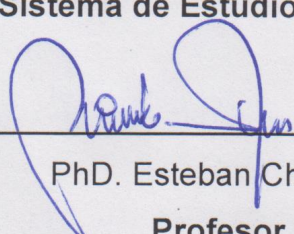
“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología con énfasis en bacteriología.



---

PhD. Bruno Lomonte Vigliotti

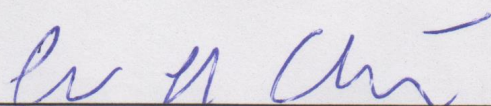
**Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado**



---

PhD. Esteban Chaves Olarte

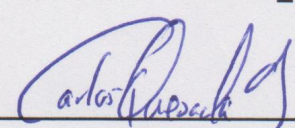
**Profesor Guía**



---

PhD. Carlos Chacón Díaz


**Lector**



---

PhD. Carlos Quesada Gómez

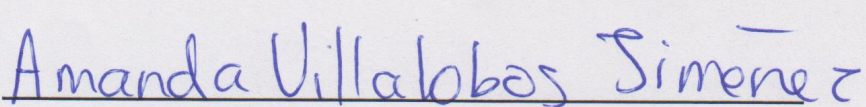
**Lector**



---

PhD. Laura Monturiol Gross

**Representante del Director Programa de Posgrado en Microbiología,  
Parasitología, Química Clínica e Inmunología**



---

Amanda Lucía Villalobos Jiménez

**Sustentante**

## Tabla de contenido

<b>Dedicatoria.....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Hoja de Aprobación .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de cuadros:.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras: .....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>xi</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2.1. Generalidades de <i>Clostridioides difficile</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>2.2. Patogénesis de CDI.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3. Locus de patogenicidad (PaLoc) .....</b>	<b>3</b>
<b>2.4. Mecanismos de acción de TcdA y TcdB .....</b>	<b>4</b>
<b>2.5. Efecto citopático y citotóxico .....</b>	<b>7</b>
<b>2.6. Variabilidad del PaLoc .....</b>	<b>8</b>
<b>2.7. Cepas del genotipo NAP1/027.....</b>	<b>10</b>
<b>2.8. Cepas hipervirulentas y virulentas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.10. Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>2.11. Objetivo general .....</b>	<b>14</b>
<b>2.12. Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Generación del dominio de unión al receptor recombinante .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. Recombinación de vectores.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2. Síntesis de plásmidos.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Producción de TcdBs .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Ensayos de citotoxicidad .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Ensayos de modificación de sustrato .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Marcaje fluorescente de proteínas .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 Ensayo de competencia de unión a receptores .....</b>	<b>20</b>
<b>4.Resultados.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Generación de los dominios de unión al receptor por recombinación de vectores .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Generación de los dominios de unión al receptor por síntesis de plásmidos ..</b>	<b>26</b>

<b>4.3. Ensayos de citotoxicidad.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Ensayos de modificación de sustrato .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Marcaje fluorescente de los dominios de unión al receptor.....</b>	<b>46</b>
<b>4.6 Ensayo de especificidad de la unión a receptores.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 1. Cuantificación de RBDs utilizados .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo 2. Secuencia optimizada utilizada para la síntesis del plásmido del RBD<sub>VPI</sub></b> .....	<b>70</b>
<b>Anexo 3. Mapa del plásmido utilizado para generar la proteína RBD<sub>VPI</sub>.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 4. Secuencia optimizada utilizada para la síntesis del plásmido del RBD<sub>Nap1</sub></b> .....	<b>73</b>
<b>Anexo 5. Mapa del plásmido utilizado para generar la proteína RBD<sub>Nap1</sub>.....</b>	<b>75</b>

## Resumen

*Clostridioides difficile* es un bacilo anaerobio estricto, Gram positivo y formador de esporas. Es un patógeno oportunista que coloniza el colon del hospedero cuando se altera la microbiota intestinal favoreciendo la replicación de esta bacteria. En este escenario se producen dos toxinas responsables de la patogénesis, toxina A y toxina B, siendo esta última el principal factor de virulencia. La TcdB, cuenta con un dominio de unión al receptor responsable del primer paso en el proceso de intoxicación al permitir la unión de la toxina con los receptores de la superficie de la célula eucariota. Esta toxina cuenta con un dominio que se encarga de inactivar las GTPasas de la familia Rho y Ras provocando un colapso del citoesqueleto que conduce a una interrupción de las uniones celulares estrechas dentro del epitelio intestinal y a la pérdida de la función de barrera epitelial.

*C. difficile* es una especie muy variable en cuanto a la distribución genética de las cepas que la componen y el grado de virulencia de estas. Una cepa en particular, la cepa NAP1/027, ha demostrado un alto grado de virulencia y un potencial epidémico incrementado. Varias características de esta cepa han sido postuladas como responsables de su alto grado de virulencia, entre ellas la hiperproducción de toxinas, una alta capacidad de esporulación, resistencia a antibióticos y una actividad biológica incrementada de la TcdB. En el presente trabajo nosotros hemos abordado la hipótesis del uso diferencial de receptores para explicar esta actividad incrementada.

En este trabajo se generaron a través de la síntesis de plásmidos los dominios de unión al receptor de la cepa LIBA-5758 del genotipo NAP1/027 y de la cepa de referencia VPI 10463, los cuales presentaron características estructurales y biológicas similares a los dominios dentro de ambas TcdBs. Esta estrategia permitió la realización de ensayos de citotoxicidad donde se evidencia que cada RBD generado es capaz de retrasar el ingreso de su TcdB correspondiente pero no interfiere en el proceso de intoxicación de la otra TcdB. De igual forma se logró evidenciar un retraso en el proceso de glicosilación en la GTPasa monomérica RhoA, al aplicar cada RBD con su TcdB correspondiente en distintas líneas celulares.

Se logró evidenciar la especificidad de cada RBD generado con los receptores en la superficie celular en distintas líneas celulares los cuales además corresponden con la sensibilidad de estas células por cada TcdB de ambas cepas estudiadas, de forma que se evidencia que la TcdB de la cepa NAP1/027 utiliza receptores distintos o adicionales a los utilizados por la TcdB de la cepa de referencia VPI 10463.

**Lista de cuadros:**

Cuadro 1. Promedio de TcdB<sub>VPI</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.....42

Cuadro 2. Promedio de TcdB<sub>Nap1</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.....42

Cuadro 3. Promedio de TcdB<sub>Nap1v</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.....43



## Lista de figuras:

<b>Figura 1.</b> Modelo de TcdB de <i>C. difficile</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Modelo molecular de la intoxicación celular ejercido por las toxinas de <i>C. difficile</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> Generación de RBD <sub>VPI</sub> por recombinación de vectores.....	23
<b>Figura 4.</b> Generación de RBD <sub>Nap1</sub> por recombinación de vectores.....	25
<b>Figura 5.</b> Generación de RBD <sub>Nap1</sub> por síntesis de plásmidos.....	27
<b>Figura 6.</b> Péptidos detectados en la muestra purificada de RBD <sub>Nap1</sub> , analizado por MS/MS.....	29
<b>Figura 7.</b> Generación de RBD <sub>VPI</sub> por síntesis de plásmidos.....	31
<b>Figura 8.</b> Péptidos detectados en la muestra purificada de RBD <sub>VPI</sub> , analizado por MS/MS.....	33
<b>Figura 9.</b> Análisis electroforético de TcdB y RBDs de diferentes cepas de <i>Clostridioides difficile</i> purificadas.....	35
<b>Figura 10.</b> Péptidos detectados en la muestra purificada de TcdB <sub>VPI</sub> recombinante, analizado por MS/MS.....	37
<b>Figura 11.</b> Titulación de TcdB <sub>VPI</sub> en presencia de RBD <sub>VPI</sub> y RBD <sub>NAP1</sub> , luego de 4 horas.....	38

<b>Figura 12.</b> Titulación de TcdB <sub>Nap1</sub> en presencia de RBD <sub>VPI</sub> y RBD <sub>NAP1</sub> , luego de 4 horas.....	40
<b>Figura 13.</b> Determinación de competencia entre RBD recombinantes y las respectivas toxinas mediante ensayo de glicosilación de Rho.....	45
<b>Figura 14.</b> Determinación de la unión de RBDs de las toxinas B de distintas cepas de <i>Clostridioides difficile</i> a diferentes líneas celulares.....	47
<b>Figura 15.</b> Determinación de la especificidad de la unión de los RBDs de las toxinas B de <i>Clostridioides difficile</i> en la línea células 3T3.....	49
<b>Figura 16.</b> Determinación de la especificidad de la unión de los RBDs de las toxinas B de <i>Clostridioides difficile</i> en la línea células CHO.....	51

## **Lista de abreviaturas**

3T3: línea celular de fibroblastos

ACT: toxinas adenilato ciclasa

CDI: infecciones por *C. difficile*

CDT: toxina binaria

CHO: línea celular de ovario de hámster chino

CPD: dominio cisteína proteasa

CSPG4: proteoglicano de sulfato de condroitina 4

FZD1, FZD2 y FZD7: receptores Wnt de la familia frizzled

GTD: dominio glucosil transferasa

ELISA: Ensayo inmune ligado a enzimas

HeLa: línea celular humana

HR: región hidrofóbica

INF $\gamma$ : interferón  $\gamma$

InsP6: hexakisfosfato de inositol

IPTG: Isopropil- B-D-1-tiogalactopiranosido

MS/MS: Espectrometría masas- masas

PaLoc: locus de patogenicidad

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado

PVDF: fluoruro de polivinilideno, membrana usada en Western blot

PVRL3: receptor de poliovirus tipo 3

RBD: dominio de unión al receptor

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TcdA: toxina A

TcdB: toxina B

TcdB<sub>NAP1</sub>: toxina B de la cepa NAP1/027

TcdB<sub>NAP1v</sub>: toxina B de la cepa NAP1/027 variante

TcdB<sub>VPI</sub>: toxina B de la cepa VPI 10463

tcdC: regulador negativo

tcdE: holina

tcdR: regulador positivo

TD: dominio de translocación

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular

TNF $\alpha$ : factor  $\alpha$  de necrosis tumoral



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Amanda Luc ía Villalobos Jiménez, con cédula de identidad 115600948, en mi condición de autor del TFG titulado CONSECUENCIAS BIOL GICAS DE LAS VARIACIONES EN LOS DOMINIOS DE UNI N A RECEPTOR DE TOXINA B DE CEPAS CL `SICAS E HIPERVIRULENTAS DE CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

*Amanda Villalobos Jiménez*

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## **2. Introducción**

### **2.1. Generalidades de *Clostridioides difficile***

*Clostridioides difficile*, antes conocido como *Clostridium difficile* son bacilos anaerobios estrictos, Gram positivo y formadores de esporas. Esta bacteria es la causa más común de infecciones nosocomiales en los países de alto ingreso (Chen y Jin, 2021). Desde el año 2000, las infecciones por *C. difficile* (CDI, por sus siglas inglés) han aumentado en prevalencia y se han vuelto más difíciles de tratar por la adquisición de mecanismos de resistencia a los antibióticos de elección (Chen *et al.*, 2015). En los Estados Unidos, las estimaciones del 2017 determinaron que los pacientes con CDI son más de 508,000 anualmente con cerca de 16,000 muertes (Guh *et al.*, 2020).

El espectro de enfermedades conocidas colectivamente como CDI varían en severidad desde diarrea leve y autolimitada hasta colitis pseudomembranosa y megacolon tóxico. Esta última es la forma más grave de enfermedad, consiste en una dilatación aguda del colon y toxicidad sistémica y a menudo conlleva a la muerte (Awad *et al.*, 2014).

Esta bacteria posee dos estadios, células vegetativas metabólicamente activas y esporas. Sus esporas son resistentes al oxígeno, al calor y a muchos desinfectantes comerciales (Purcell *et al.*, 2017).

## 2.2. Patogénesis de CDI

En un individuo sano, el microbioma humano consiste en billones de microorganismos que trabajan en sinergia con el hospedero. Uno de los beneficios de esta interacción es que el hospedero recibe protección contra los patógenos. *C. difficile* es un patógeno oportunista que coloniza el colon del hospedero cuando se altera la microbiota intestinal, generalmente como resultado de la terapia con antibióticos administrada para una afección no relacionada a CDI (Naggie *et al.*, 2011).

La alteración de la microbiota intestinal, no solo facilita la colonización por parte de *C. difficile*, sino que además facilita subsecuentes episodios de reinfección por parte de la misma cepa u otras cepas de esta bacteria, al punto que entre 18 a 35% de los pacientes tratados por CDI llegan a presentar de nuevo síntomas entre las 2 y 8 semanas después de ser tratados (Hernández *et al* 2020).

Después de ingresar al hospedero en la forma de esporas, *C. difficile* pasa a través del estómago hacia el intestino delgado, donde comienza el proceso de germinación, y finalmente pasa a la forma de células vegetativas metabólicamente activas (Awad *et al.*, 2014). Las esporas de *C. difficile* identifican señales de un ambiente favorable para la germinación por medio de la detección de ácidos biliares secundarios intestinales que se relacionan con la alteración de la microbiota intestinal (Khoruts *et al*, 2020).

La colonización y la proliferación ocurren predominantemente en el ambiente anaerobio del colon descendente. Luego esta bacteria produce toxinas, lo que

provoca daños en los tejidos del hospedero y produce el desarrollo de la enfermedad (Awad *et al.*, 2014).

### **2.3. Locus de patogenicidad (PaLoc)**

Las infecciones por *C. difficile* están mediadas por toxinas, la toxina A (TcdA), la toxina B (TcdB) y la toxina binaria (CDT) (Rupnik y Janezic, 2016). La TcdB es el principal factor de virulencia (Di Bella *et al.*, 2016).

Los genes que codifican por TcdA y TcdB se encuentran en el locus de patogenicidad de 19,6 kb (PaLoc), el cual también contiene otros tres marcos de lectura abiertos, incluida la holina E (*tcdE*), el regulador R (*tcdR*) que tiene una función como factor sigma alternativo en la regulación positiva de la expresión de genes PaLoc y *tcdC*, que juega un papel importante como regulador negativo de la producción de TcdA y TcdB (Awad *et al.*, 2014).

TcdA y TcdB tienen aproximadamente un 66% de similitud a nivel de aminoácidos, lo que sugiere que las toxinas podrían haber surgido a través de un evento de duplicación génica. Las toxinas comparten múltiples dominios conservados, como se observa en la figura 1, entre ellos el dominio glucosil transferasa (GTD), el dominio cisteína proteasa (CPD), una región hidrofóbica (HR) y un dominio de translocación (TD) (Awad *et al.*, 2014).



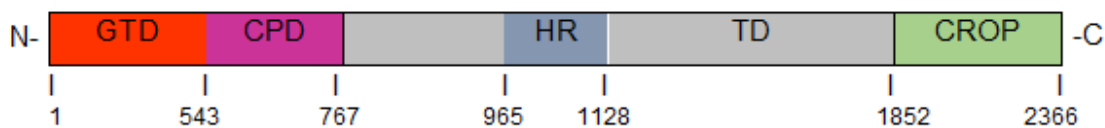


Figura 1. Modelo de TcdB de *C. difficile*

## 2.4. Mecanismos de acción de TcdA y TcdB

Se ha establecido un modelo de seis pasos de cómo las toxinas llevan a cabo la intoxicación celular. Para la TcdB purificada de la cepa VPI 10463, se han identificado tres receptores a nivel de las células eucariotas: el receptor de poliovirus tipo 3 (PVRL3), el proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4) y ciertos receptores Wnt de la familia frizzled (FZD1, FZD2 y FZD7) (Chung *et al.*, 2018).

De acuerdo con lo demostrado por Chung *et al.*, (2018), TcdB<sub>NAP1</sub> exhibe solo una unión débil a FZD2. Debido a variaciones en los aminoácidos involucrados en la interacción de TcdB<sub>VPI</sub> con FZD2, que no se conservan en el equivalente TcdB<sub>NAP1</sub>, también en el extremo C de TcdB<sub>NAP1</sub>, la llamada región B2' (residuos de aminoácidos 1651-1852), representa la secuencia más variable en comparación con la TcdB de referencia, lo que podría apoyar la teoría que TcdB<sub>NAP1</sub> y TcdB<sub>VPI</sub> utilizan receptores diferentes o adicionales para la entrada celular (López-Ureña, 2019).

Los FZD son una familia de receptores transmembrana asociados a la vía de señalización Wnt. La unión de TcdB a FZD, especialmente FZD1, -2 y -7, no solo media la entrada de toxinas, sino que también inhibe la señalización de Wnt, una vía que regula la autorrenovación de las células madre del colon y la diferenciación

del epitelio del colon. Este proceso lleva a la acumulación severa de líquido sanguinolento y congestión vesicular en el intestino (Chen *et al.*, 2018).

De acuerdo con López-Ureña *et al.*, (2019) la TcdB de la cepa VPI 10463 cuenta con un dominio de unión al receptor (RBD) que abarca los residuos 1349-1811, que se observan en la figura 1 y forma parte del primer paso en el proceso de intoxicación al permitir la unión de la toxina con los receptores de la superficie de la célula eucariota (Di Bella *et al.*, 2016).

En la figura 2 se observa la unión del RBD a los receptores de la superficie celular, esta unión luego desencadena la endocitosis de las toxinas, que deriva en el tráfico de las toxinas a los endosomas tempranos dentro de la célula del hospedero. La acidificación del compartimento endosómico induce un cambio conformacional en las toxinas, lo que lleva a la inducción de un cambio conformacional. Se hipotetiza que un dominio de translocación hidrofóbico, ubicado centralmente dentro de las toxinas, está involucrado en la formación de poros y la inserción de las toxinas en la membrana endosómica (Tian *et al.*, 2017).

El dominio CPD y el dominio GTD se translocan a través de la membrana endosómica, y las toxinas se unen a la molécula derivada de la célula hospedera hexakisfosfato de inositol (InsP6), que induce un cambio conformacional dentro del CPD y conduce a la escisión autocatalítica en un sitio ubicado entre la cisteína proteasa y los dominios de glucosiltransferasa. Este evento de escisión da como resultado la liberación del dominio activo glucosiltransferasa N-terminal de la toxina en el citosol de la célula del hospedero (Tian *et al.*, 2017).

Después de su liberación en el citosol, las regiones N-terminales de TcdA y TcdB inactivan una serie de proteínas celulares que pertenecen a la familia Rho de GTPasas monoméricas, incluidas Rho A, B, C, G, Rac1–3 y Cdc42 y de la familia Ras. Ambas toxinas son monoglucosiltransferasas e inactivan estas GTPasas a través de la transferencia covalente de un residuo de glucosa a estas proteínas (Gerhard *et al.*, 2008).

Esta glucosilación mediada por toxinas bloquea estas GTPasas en una conformación inactiva, lo que afecta a varias vías celulares importantes reguladas por las mismas. La intoxicación de las células con TcdA y TcdB conduce a una pérdida de integridad estructural debido a la desregulación de la despolimerización de actina y una disminución asociada en los niveles celulares de F-actina, resultando en un fenotipo característico de "redondeo celular" que normalmente precede a la caspasa-3 y la apoptosis celular mediada por la caspasa-9 (Awad *et al.*, 2014).

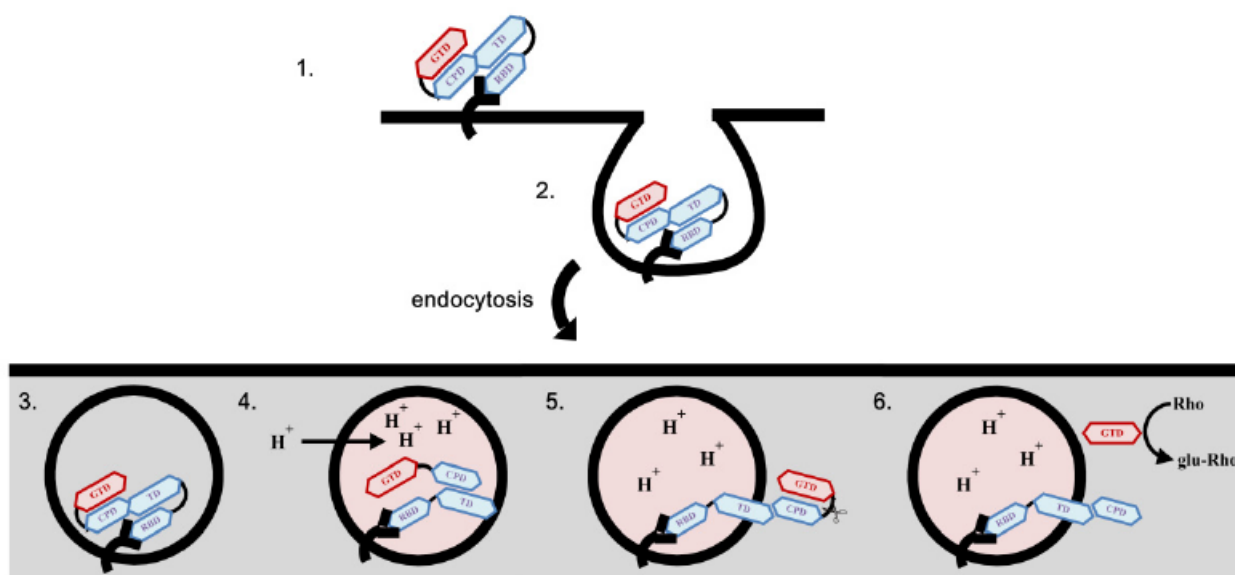


Figura 2. Modelo molecular de la intoxicación celular ejercido por las toxinas de *C. difficile*. Incluye 1. Unión del RBD a los receptores de la superficie celular, 2. Endocitosis de las toxinas, 3. Tráfico de las toxinas a los endosomas tempranos dentro de la célula del hospedero, 4. Acidificación del compartimento endosómico induce un cambio conformacional en las toxinas, 5. Liberación del dominio activo glucosiltransferasa N-terminal de la toxina en el citosol de la célula del hospedero y 6. Las regiones N-terminales de TcdB inactivan proteínas de la familia Rho de GTPasas monoméricas. Fuente: Chen *et al.*, (2015).

## **2.5. Efecto citopático y citotóxico**

El colapso del citoesqueleto conduce a una interrupción de las uniones celulares estrechas dentro del epitelio intestinal y a la pérdida de la función de barrera epitelial. Colectivamente, estos efectos inducen un aumento de la permeabilidad intestinal y acumulación de líquido que posteriormente se manifiesta como diarrea, un síntoma distintivo de CDI (Awad *et al.*, 2014).

TcdB también es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, a concentraciones altas, lo que lleva a la muerte celular por un mecanismo necrótico (LaFrance *et al.*, 2015).

La producción de múltiples citocinas proinflamatorias como IL-8, IL-12, IL-18, IL-1 $\beta$ , interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), así como neuropéptidos, provocan el inicio de una respuesta inflamatoria profunda. Es probable que esta respuesta desempeñe un papel importante en la gravedad del daño al tejido del hospedero que ocurre durante la infección. La respuesta

proinflamatoria mediada por toxinas también es otra característica importante de CDI (Awad *et al.*, 2014).

## **2.6. Variabilidad del PaLoc**

Las cepas de *C. difficile* muestran una heterogeneidad significativa. Las cepas pueden ser agrupadas de acuerdo con distintos métodos de tipificación (ribotipo, electroforesis en gel de campo pulsado, toxinotipo, entre otros). Según la secuencia del PaLoc a la cepa de referencia VPI 10463 se ha categorizado como el toxinotipo 0, respecto a la tipificación por enzimas de restricción denominado toxinotipificación (Rupnik, 2008). Todas las cepas que tienen PaLoc que difieren de este se han asignado a uno de los 34 toxinotipos variantes, designados por números romanos del I – XXXIV, (Rupnik y Janezic, 2016). Dentro de esa variabilidad hay cepas con diferente grado de virulencia.

A partir de esto se ha podido distinguir las cepas hipervirulentas, pertenecientes al toxinotipo III las cuales han sido clasificadas a través de distintos métodos como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) en el tipo 1 y por la ribotipación por PCR en el ribotipo 027. Por lo que generalmente se denomina NAP1/027.

Los cambios en el PaLoc observados en estos toxinotipos variantes son inserciones, deleciones y mutaciones puntuales. Las consecuencias de cambios importantes en el PaLoc son la ausencia de producción de una o ambas toxinas, la producción de toxinas con propiedades alteradas o la hiperproducción de toxinas (Connor, Johnson & Gerding, 2009).

Entre los métodos de clasificación de las distintas cepas se encuentra el PFGE que fue uno de los primeros métodos de tipificación molecular descritos para *C. difficile*, se trabaja con enzimas de restricción que cortan el genoma completo. Se utiliza la enzima SmaI que genera de 7 a 15 fragmentos de restricción que van de 10 a 1.100 kbp, o la enzima SacII que genera de 10 a 20 fragmentos en el mismo rango de tamaño, a partir de los perfiles de banda se pueden analizar las cepas que con 80% de similitud en el patrón de banda generalmente se consideran como un solo pulsotipo. América del Norte utiliza NAP y número de tipo para la designación de pulsotipos (Janezic & Rupnik, 2010).

También existe el método por ribotipado por PCR se basa en la amplificación de la región espaciadora intergénica (ITS) entre 16S y 23S rDNA. Debido a que este operón está presente en varias copias en el genoma de *C. difficile* y las copias también difieren en la longitud de ITS, un solo cebador puede dar como resultado un patrón de bandas que van desde 200 a 700 pb. Las bandas generalmente se visualizan en un gel de agarosa. Una sola diferencia de banda representa un nuevo ribotipo (Janezic & Rupnik, 2010).

Por su parte los estudios filogenómicos que utilizan la tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés) y la comparación genómica completa de cepas de *C. difficile* han identificado 6 clados principales. Las cepas que causan enfermedades humanas se encuentran dentro de todos los clados, lo que indica que, a pesar de la amplia diversidad genética, existe un gran grupo de cepas de *C. difficile* potencialmente patógenas que contienen loci de virulencia (Lim,

*et al.*, 2014). La producción de toxinas varía según el clado; el más divergente, C-I, no produce ni toxina binaria, ni las dos toxinas principales, la toxina A y la TcdB. Las cepas pertenecientes a los clados 2, 3 y 5 producen toxina binaria, mientras que la mayoría de los genotipos dentro de los clados 1-3 producen toxinas A y B. El clado 4 es en gran parte no tóxico, excepto por las cepas de toxinotipo VIII ST37 y ribotipo 017 que solo producen TcdB (Elliott *et al.*, 2014).

## **2.7. Cepas del genotipo NAP1/027**

Las cepas de NAP1/027 se han extendido ampliamente en los últimos años. Estas cepas han sido responsables de brotes epidémicos graves en todo el mundo. En el caso de los hospitales a lo largo de Estados Unidos se informó de un aumento en el número de casos graves de CDI entre 2001 y 2003; se determinó que estos correspondían a CDI asociada a la cepa NAP1/027. Esto fue seguido por brotes de CDI en 2003–2004 y luego en 2004–2005, en Reino Unido. Posteriormente, se han seguido documentado casos causados por NAP1/027 en Estados Unidos, Canadá y numerosos países europeos, (Killgore *et al.*, 2008).

En el caso de Costa Rica entre 2009 y 2010, se produjo un brote de *C. difficile* en un hospital de atención terciaria. En un estudio preliminar realizado con una colección parcial de aislamientos de este brote, se informó la presencia del genotipo NAP1/027. Posteriormente se determinó la presencia en dicho brote de un genotipo emergente altamente resistente a las fluoroquinolonas con una delección en *tcdC* similar a las cepas NAP1/027. Este genotipo fue clasificado como una variante de

*C. difficile* con alto potencial de virulencia, y fue denominado NAP<sub>CR</sub> (Quesada-Gómez *et al.*, 2015).

## 2.8. Cepas hipervirulentas y virulentas

Los fenotipos de las cepas hipervirulentas e históricas de *C. difficile* presentan diferencias fenotípicas importantes ya que *C. difficile* NAP1/027 produce más toxinas y esporula con mayor eficiencia que las cepas históricas y son resistentes a las fluoroquinolonas debido a mutaciones en los genes de la ADN girasa (Lanis *et al.*, 2010).

Además, los aislamientos de la cepa NAP1/027 producen una proteína TcdB<sub>NAP1</sub>, que se ha demostrado que es más citotóxica y muestra un tropismo tisular más amplio que la TcdB producido por cepas históricas. Estas diferencias fenotípicas pueden permitir que la TcdB de la cepa NAP1/027 (TcdB<sub>NAP1</sub>) inflija daño más grave y generalizado al hospedero después de la infección con estas cepas particulares de *C. difficile* (Awad *et al.*, 2014).

Lanis *et al.* (2010) sugirieron que el aumento del potencial citotóxico de TcdB<sub>NAP1</sub> se explica por su capacidad para ingresar a las células blanco más rápidamente y en una etapa más temprana de la endocitosis y por el hecho de que el autoprosesamiento ocurre de manera más eficiente en TcdB<sub>NAP1</sub>. Esta toxina sufre cambios conformacionales hidrofóbicos a un pH más alto que la toxina de la cepa clásica, y esto se correlaciona con una entrada celular más rápida.

Los primeros estudios de Stabler *et al.*, (2009) mostraron que las TcdBs de las cepas NAP1/027 exhiben una variación significativa en su secuencia en



comparación con las TcdB producidas por cepas clásicas no epidémicas. Luego en ensayos con pez cebra y ratones, se sugirió que TcdB de cepas de *C. difficile* NAP1/027 es más citotóxica que TcdB de cepas clásicas.

López-Ureña *et al.* (2019) compararon a las dos toxinas, TcdB<sub>VPI</sub> y TcdB<sub>NAP1</sub> en diferentes pasos de la intoxicación, determinando que el autoprocesamiento y los sustratos modificados son iguales. Contrario a Lanis *et al.* (2010 y 2012), que sugirieron que el aumento del potencial citotóxico de TcdB<sub>NAP1</sub> se explica por su capacidad de ingresar a las células objetivo más rápidamente, en una etapa más temprana de la endocitosis y que el autoprocesamiento ocurre de manera más eficiente en TcdB<sub>NAP1</sub>.

Al inyectar ambas toxinas en el modelo de asa ligada se observó que *in vivo* TcdB<sub>NAP1</sub> es más potente que TcdB<sub>VPI</sub>. También utilizaron una toxina variante de NAP1/027 previamente reportada que difiere solo en el dominio de glucosiltransferasa (TcdB<sub>NAP1V</sub>) para hacer el experimento de competencia donde se vio que existen diferencias en la utilización y unión de factores de entrada en las células del hospedero (López-Ureña *et al.*, 2019).

En el caso de otras bacterias se ha visto una relación directa en el efecto que poseen sus receptores con respecto a la actividad biológica como es en el caso del estudio realizado por Etxaniz *et al.* (2019), donde las toxinas adenilato ciclasa (ACT) de *Bordetella pertussis* pueden diferir en su potencia con base en variaciones de la interacción toxina-célula. Esta toxina utiliza su dominio C-terminal, el cual se encarga de interactuar con la membrana celular del hospedero, para formar poros en las células que conduce a la lisis celular, pero al aplicar iguales concentraciones

de una toxina mutante que no posee ese dominio C-terminal, las toxinas también formaron poros, pero estos fueron reparables por la célula infectada y no conducen a la lisis celular.

También existe una similitud de cerca del 71% entre la TcdB de *C. difficile* y la toxina letal de *C. sordelli*, a pesar de esto no utiliza ni los receptores FZD ni CSPG4, en su lugar se une a semaforinas, de una forma similar a la que utiliza la TcdB de la cepa de referencia VPI10463 con los receptores FZD (Chen y Jin, 2021).

En estudios realizados sobre la estructura de la TcdB, existen cerca de un 8% de variación entre las secuencias de cepas virulentas e hipervirulentas, esta diferencia parece generar un impacto sobre la actividad y patogénesis de la TcdB, alterando la capacidad de unión a receptores de estas. Entre las diferencias detectadas se encuentra la sustitución de un residuo de fenilalanina por una serina, lo que podría significar la pérdida de la capacidad de unión a receptores FZD, que sí tiene la TcdB de la cepa de referencia (Chen y Jin, 2021).

Por lo tanto, se propone la hipótesis que TcdB<sub>NAP1</sub> utiliza receptores diferentes o adicionales para ingresar a las células, lo que proporciona una posible explicación de su mayor actividad biológica.

## 2.9. Justificación

*C. difficile* causa enfermedades gastrointestinales graves, que pueden incluso llevar a la muerte, y es la causa más importante de diarrea adquirida en los hospitales en muchos países, lo que supone una carga económica considerable para los sistemas de salud (Carter *et al.*, 2015).

Se ha determinado que existen diferencias biológicas en la actividad de las toxinas B entre las cepas clásicas (VPI 10463) y cepas hipervirulentas (NAP1/027). De igual forma existen diferencias en las secuencias de los dominios de unión al receptor de las toxinas B entre ambas cepas (López-Ureña *et al.*, 2019).

Las variaciones de secuencia en uno o más de los dominios funcionales de TcdB podrían explicar las diferencias en la citotoxicidad entre aislados históricos e hipervirulentos (Lanis *et al.*, 2010).

Hay evidencias preliminares de que las toxinas B de cepas virulentas e hipervirulentas utilizan un receptor diferente de unión a las células en el intestino de mamíferos (López-Ureña *et al.*, 2019). Entonces, este trabajo pretende contribuir a entender si en efecto el receptor es diferente.

Ante esto se plantea como pregunta de trabajo: ¿se utilizan receptores diferentes entre cepas virulentas e hipervirulentas, de forma que las toxinas B de *C. difficile* presenta actividad biológica diferente en modelos de patogenicidad?

## **2.10. Hipótesis**

Las toxinas B de la cepa clásica VPI 10463 de *Clostridioides difficile* y de la cepa hipervirulenta, LIBA-5758 del genotipo NAP1/027, usan distintos receptores de membrana para ingresar a la célula lo cual explicaría las diferencias en el efecto biológico en modelos de virulencia de ambas toxinas.

## **2.11. Objetivo general**

Determinar si las diferencias en el efecto biológico de las las toxinas B de las cepas VPI 10463 y NAP1/027 de *C. difficile* está relacionado con los receptores que utilizan para para reconocer su célula blanco.

## **2.12. Objetivos específicos**

- 2.13.1. Obtener mediante ingeniería genética los dominios de unión al receptor de las toxinas B, de las cepas VPI 10463 y NAP1/027
- 2.13.2. Determinar si las toxinas B de las cepas VPI 10463 y NAP1/027 utilizan receptores diferentes mediante experimentos de competencia con los RBD recombinantes.
- 2.13.3. Determinar si el patrón de unión de los dominios de unión al receptor en cultivos celulares de las toxinas B para ambas cepas de *C. difficile* es diferente.

### 3. Metodología

#### 3.1 Generación del dominio de unión al receptor recombinante

##### 3.1.1. Recombinación de vectores

Se realizó la extracción de ADN genómico de *C. difficile* de acuerdo con la metodología propuesta por Sim *et al.*, (2015), con el fin de amplificar los dominios de unión al receptor de las toxinas B de ambas cepas utilizando los primers que se diseñaron específicamente para la cepa LIBA-5758 del genotipo NAP1/027 (5'-GGAAGGTGGCTCAGGTCATA-3' y 3'-TTGTTTCTCCGACTGAAGCA-5') y para la cepa VPI 10463 (ATGGAAGGTGGTTCAGGTCA y CGCCTACAGTCACAAATCCA).

Estos dominios se clonaron en vectores PCR8GW (Invitrogen) y se transfirieron a plásmidos pDest17 (Invitrogen) con el fin de obtener en el mismo marco de lectura una fusión con una secuencia codificante para seis residuos de histidina, estos se expresaron en células competentes top 10 para generar un stock de bacterias que se pudieran conservar a -80°C, luego los plásmidos se extrajeron con el kit QIAprep spin miniprep de QIAGEN, para producir proteínas recombinantes con células BL21AI de *E. coli*.

A partir de cultivos en medio líquido con ampicilina, se indujo la producción de los RBDs con L-Arabinosa, para luego purificarlos por columnas de resina quelante de níquel (Ni-NTA) y almacenadas en alícuotas de 1 ml para su posterior uso.

Se midió la concentración de proteína de cada alícuota y se determinó la pureza por medio de SDS-PAGE, y se realizó Western blot para confirmar la

identidad de las proteínas obtenidas, utilizando anticuerpos que reconocen los residuos de histidina que acompañan los RBD.

### **3.1.2. Síntesis de plásmidos**

Se diseñó mediante bioinformática la secuencia optimizada de aminoácidos que codifica por el RBD de ambas cepas, los cuales se sintetizaron en plásmidos pET30a+, unidos a una secuencia que codifica por seis residuos de histidina localizada en el extremo N terminal. Estas secuencias se enviaron a un servicio de síntesis de plásmidos (GenScript USA Inc.). A partir de estos plásmidos se transformaron células BL21 DE3.

A partir de cultivos en medio líquido con kanamicina, se indujo la producción de estos dominios con IPTG, los cuales fueron purificados con de columnas de resina quelante de níquel (Ni-NTA). Se realizó una ultrafiltración para reemplazar el imidazol, del medio en el que se encuentran los RBD, por PBS al 1%.

Se midió la concentración de proteína de cada alícuota y se determinó la pureza por medio de SDS-PAGE, además se analizaron las proteínas obtenidas por medio de espectrometría de masas en tándem las proteínas obtenidas, al Instituto Clodomiro Picado, para confirmar la identidad de estas.

## **3.2 Producción de TcdBs**

Se siguió la metodología propuesta por Yang *et al.*, (2008), para la expresión y purificación de la holotoxina TcdB de *C. difficile* a partir de *Bacillus megaterium*, a

partir de cultivos en medio líquido con tetraciclina. Para esto, se indujo la producción de las proteínas con xilosa, las cuales fueron purificadas con de columnas de resina quelante de níquel (Ni-NTA). Se realizó una ultrafiltración para remplazar el imidazol del medio en el que se encuentran las proteínas con 20mM Tris y 150 mM NaCl a pH 7,5.

Se midió la concentración de proteína de cada alícuota y se determinó la pureza por medio de SDS-PAGE. Además, se analizaron las proteínas obtenidas medio de espectrometría de masas en tándem las proteínas obtenidas, al Instituto Clodomiro Picado, para confirmar la identidad de estas.

### **3.3 Ensayos de citotoxicidad**

Se utilizaron células HeLa, CHO y 3T3 confluentes, cultivadas en placas de 96 pocillos, a las que se les aplicaron RBD recombinantes y luego de incubarlas por 30 minutos a 4 °C, se intoxicaron con TcdB de las diferentes cepas y se realizaron diluciones seriadas. El porcentaje de células redondas en cada pocillo se evaluó de forma visual con un microscopio óptico invertido, cada hora durante un período de 4 horas. Para obtener el porcentaje de efecto citopático a lo largo del tiempo. También se realizaron un control para cada experimento en el que se aplicó solo la toxina y solo el RBD utilizado.

### **3.4 Ensayos de modificación de sustrato**

Se utilizaron células CHO y 3T3 confluentes, cultivadas en placas de 24 pocillos, a las que se les aplicaron 13 nM de RBD<sub>VPI</sub> o 9 nM de RBD<sub>Nap1</sub> y luego de

incubarlas por 30 minutos se intoxicaron con 11 pM TcdB de las diferentes cepas, en las mismas concentraciones que se utilizaron en los experimentos de citotoxicidad. Se obtuvieron lisados celulares, se separaron las proteínas lisadas en geles de SDS-PAGE al 10% y luego se transfirieron a membranas de PVDF para hacer Western blot.

La glucosilación de Rho A se determinó con anticuerpos monoclonales (ab54835, Abcam, Cambridge, UK), que no reconocen las isoformas modificadas, anti-Rho A. Como control se detectó actina con anti-actina de conejo (A2066; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **3.5 Marcaje fluorescente de proteínas**

Los RBD purificados fueron marcardos fluorescentemente mediante los kits: FluoReporter® FITC Protein Labeling de invitrogen y el kit *Alexa Fluor*® 647 Microscale Protein Labeling (Invitrogen). Lo cual generó un conjugado con las aminas primarias de cada proteína, pero ambas metodologías produjeron una fluorecencia muy tenue.

También, se realizó marcaje de RBD purificados con el kit EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation (Thermo Scientific) que generó un conjugado entre biotina con las aminas primarias de cada proteína. Las proteínas biotiniladas a su vez se unen a estreptavidina, la cual puede estar conjugada a Alexa Fluor 546. Todos los marcajes se llevaron a cabo en células confluentes de CHO, 3T3 y Hela, con portaobjetos de vidrio, en placas de 24 pocillos y se observaron en un microscopio de fluorescencia.



### 3.6 Ensayo de competencia de unión a receptores

En células 3T3 confluentes, cultivadas en placas de 24 pocillos con slides de vidrio, se aplicaron 1,25  $\mu\text{M}$  RBD<sub>VPI</sub> marcado con biotina y se compitieron con RBD sin marcar de VPI10463 y de NAP1/027 y para esto se emplearon estos últimos 10 y 15 veces más concentrado, (12.55  $\mu\text{M}$  y 18.75  $\mu\text{M}$ ). Se utilizó estreptavidina con Alexa Fluor 546 en una dilución 1:100. Los cambios en el aumento o disminución de la fluorescencia se observaron en un microscopio de fluorescencia.

El mismo procedimiento se realizó en células CHO confluentes, cultivadas en placas de 24 pocillos con slides de vidrio, pero con concentraciones distintas. Para lo cual, se aplicaron 3.04  $\mu\text{M}$  de RBD<sub>Nap1</sub> marcado con biotina y se compitieron con RBD sin marcar de VPI10463 y de NAP1/027 10 y 15 veces más concentrado, (30.4  $\mu\text{M}$  y 45.6  $\mu\text{M}$ ).

Para ambos experimentos se realizaron controles aplicando solo la estreptavidina con Alexa Fluor 546, sin los RBDs biotinilados para detectar cualquier señal de fondo que se pudiera obtener.

## **4.Resultados**

### **4.1 Generación de los dominios de unión al receptor por recombinación de vectores**

Para poder determinar si las cepas VPI10463 y la cepa LIBA-5758 que se indica como NAP1/027 utilizan receptores distintos para ingresar a las células se empezó por tratar de generar el dominio de unión al receptor de ambas cepas por medio de recombinación de vectores. Dicha técnica consistió en la amplificación de ambos segmentos de los RBD al diseñar imprimadores que abarcaran la región de interés y que además le agregaran seis histidinas en el extremo N terminal. Los productos se analizaron mediante un gel de agarosa al 1,5%, de forma que se observaron bandas correspondientes a 2068 pares de bases para la cepa VPI 10463 y 2123 pares de bases para NAP1/027. Estos productos de PCR se clonaron en vectores PCR8GW, para luego ser recombinados a plásmidos pDest17.

A partir de estos plásmidos se realizó una PCR con otros imprimadores para determinar que la dirección de los dominios RBD se hubieran insertado correctamente en el plásmido, la comprobación de ambas cepas se dio por medio de un gel de agarosa al 1,5% donde se detectaron bandas de 876 pares de bases para el plásmido con el segmento de VPI 10463 y de 1034 pares de bases para el segmento de NAP1/027.

Se generaron células competentes BL21AI para ser transformadas con los plásmidos pDest17 con los dominios de interés, las cuales fueron cultivadas en medio LB y se indujo la producción de las proteínas de interés con L-Arabinosa, para ser detectadas por medio de la técnica de Western blot, utilizando anticuerpos

que se unieran a la cadena de seis histidinas. Las proteínas correspondientes a el dominio de unión al receptor tanto para TcdB<sub>Nap1</sub> como para TcdB<sub>VPI</sub> no fueron detectadas por los anticuerpos (figura 3).

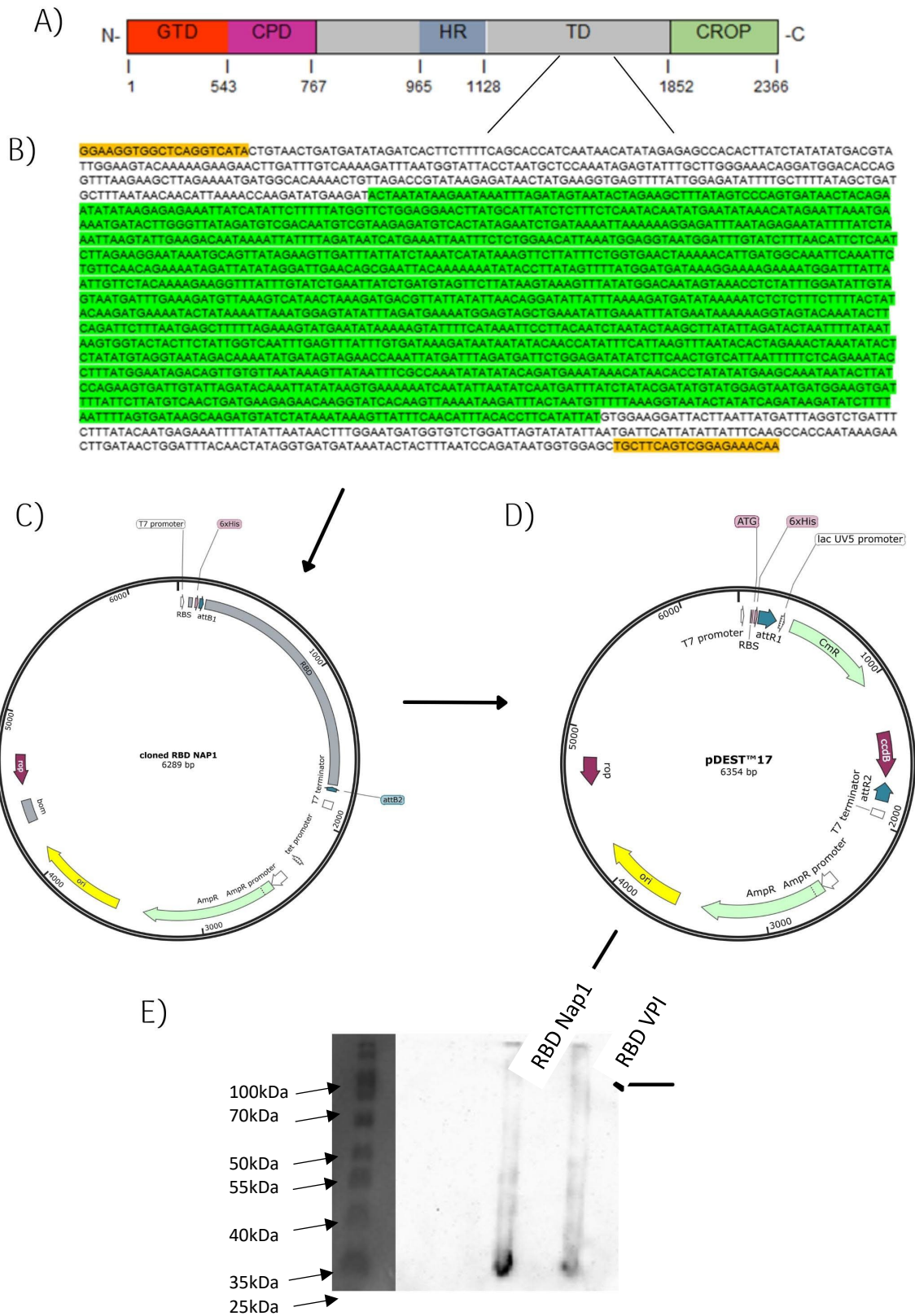


Figura 3. **Generación de RBD<sub>VPI</sub> por recombinación de vectores.** A y B) Se diseñaron plásmidos a partir de las secuencias que se encuentran en amarillo, que amplifican para la región del RBD que se encuentra marcado en verde. C) Para llevar a cabo la clonación del segmento de interés en un vector PCR8GW se amplificó la secuencia por PCR, D) Se recombinó la secuencia en un vector pDest17 utilizado para transformar células BL21AI y producir la proteína de interés. E) Se realizó el análisis por Western blot, para identificar las proteínas de interés, utilizando anticuerpos para histidina, la flecha indica el lugar esperado de la proteína RBD<sub>VPI</sub> (76.516 kDa) y la proteína RBD<sub>Nap1</sub> (78.551 kDa) que están ausentes en este proceso.

En el caso de ambas cepas el diseño de imprimadores viables en cuanto a marco de lectura y temperatura para hacer los PCRs implicó la amplificación de segmentos mayores al dominio de interés, tanto corriente arriba como corriente debajo de la secuencia (figura 3A y 4A).

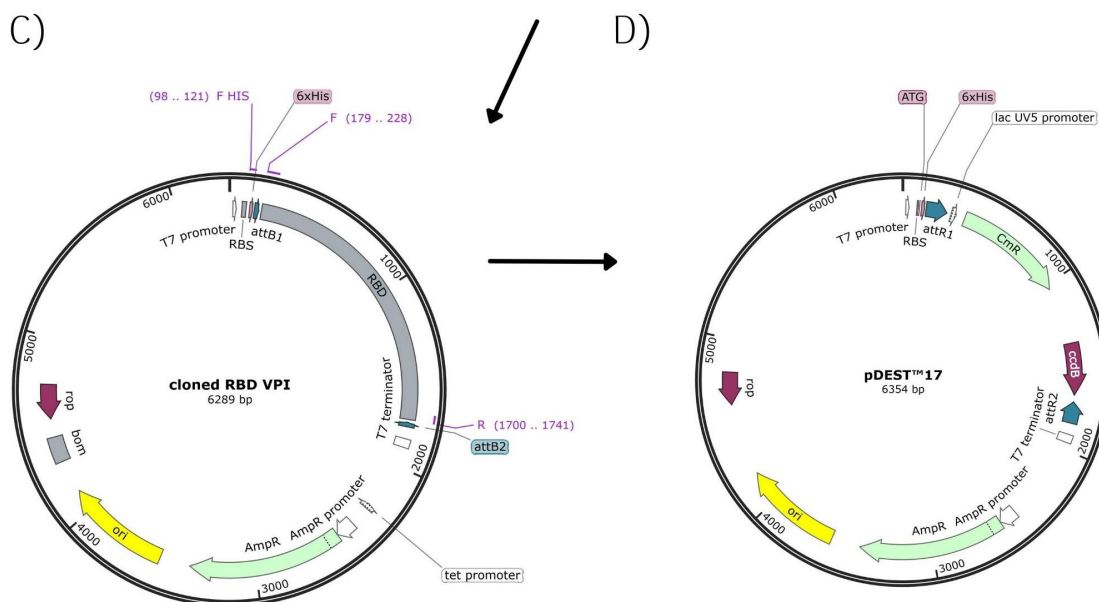
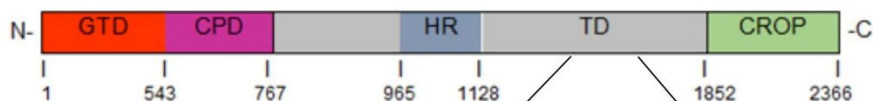


Figura 4. **Generación de RBD<sub>Nap1</sub> por recombinación de vectores.** A y B) Se diseñaron plásmidos a partir de las secuencias que se encuentran en amarillo, que amplifican para la región del RBD que se visualizan marcado en verde. C) Para llevar a cabo la clonación del segmento de interés en un vector PCR8GW se amplificó la secuencia por PCR, D) Se recombinó la secuencia en un vector pDest17 utilizado para transformar células BL21AI y producir el RBD de interés.

#### **4.2 Generación de los dominios de unión al receptor por síntesis de plásmidos**

Al no lograr obtener los resultados esperados por la metodología de recombinación de vectores, se realizó la síntesis de plásmidos para generar los RBD de cada cepa. A partir de la secuencia de aminoácidos se diseñó la secuencia optimizada de codones para producir los RBD en un vector pET-30a+, de forma que se produjeran la secuencia de aminoácidos de cada RBD con seis histidinas en el extremo amino terminal (Fig. 5 y 7)

A)



B)

ATGAATTGGTACACCCCCAATTTGAAAAAGCTCCGGCAGCAGCGGGGTCATCACCACCACCACCATGGTGGTAGCGGGGTCAGCGGCTC  
 TACCAACATCCGTATTAACCTGGACAGCAATACCCGTAGCTTCATTGTTCCGGTGATCACCACCAGAAATATCCCGCAGAAGCTATCTTACAGCT  
 TCTATGGAAGCGGGGGCACGTACGCGCTGAGCCTGTCCCAATATAACATGAACATTAACATTGAGTTAAACGAGAATGACACCTGGGTTATCGA  
 CGTTGACAACGTGGTTCGTGATGTACCATTGAGAGCGATAAAATCAAGAAAAGGTGATTTAATTGAGAACATCTGTGCGAAATTAAGCATCGAAG  
 ACAACAAGATCATCCTGGACAACCATGAAATCAACTTTAGCGGCACTCTGAACGGTGGTAATGGCTTTGTTTCTGACCTTCTCTATTTTGGAG  
 GGATCAACGCTGTGATTGAGGTTGATTTGCTGTCCAAATCATACAAAGTGCTGATCTCCGGTGAACCTGAAAACCTTGATGGCCAACTAAACAG  
 CGTGCAGCAGAAGATTGATTATATTGGTCTGAACTCCGAACTGCAAAAAAATATCCCGTATAGCTTCATGGATGACAAAAGGCAAGAGAAATGGC  
 TTTATCAATTGTTCCACGAAAAGGTTTGTTCGTGAGCGAGTTGAGCGACGCTGCTGATCTCGAAAGTGATATGGACAACAGTAAACCGC  
 TGTGGTACTGCAGCAATGACCTGAAGGACGTGAAGGTTATCACCAGGATGATGTAATTATCCTGACGGGTTACTATTTGAAGGACGACAT  
 CAAGATCTCCCTTTTCGTCCACCATCAAGACGAAAACACCATTAAGCTGAATGGCGTTTACCTGGATGAGAACGGTGTGCAGAAATCCTGAAG  
 TTCATGAACAAAAGGTTTCGACGAACACCAGCGATAGCCTGATGAGCTTCTGGAAAAGCATGAATATCAAGTCCATTTTTATTAACCTCACTCA  
 AAGCAACCAAGCTGATTTTGACACCAACTTCATCATCAGCGCACCCAGCATCGGCCAGTTTGAAGTTTCATCTGCGATAAGGACAACAAC  
 ATTCAGCCGTATTTATCAAAATCAACACCTTGGAGACAAAATATACCTCTACGTGGGTAATCGTCAGAATATGATTGTGGAACCGAATTATGAT  
 TTGACGACTCAGGTGATTTCTAGTACGGTGATAAATCTCTCAGAAATACCTGTACGGCATTGATAGCTGCGTGAATAAAGTCATCATCTC  
 TCCGAATATCTACACTGATGAGATCAACATTACTCCGATTTGAAGCGAATAATACTTACCCGGAAGTCATTGTCTGGATACCAACTACATTAG  
 CGAGAAAATTAACATTAACATCAACGATCTCAGTATTCGTTATGTTTGGTCAAACGACGGCAGCGATTTTATCCTGATGAGCAGCGATGAGGAAA  
 ATAAGGTAAGCCAAGTTAAATTCGCTTACGAATGTTTTAAAGGCAACAGATTTCTGACAAGATCTCGTTCAATTTCTCCGACAAGCAGGAGC  
 TTTCATCAACAAGGTGATTTCTACCTTACCCCAAGCTACTAC

C)

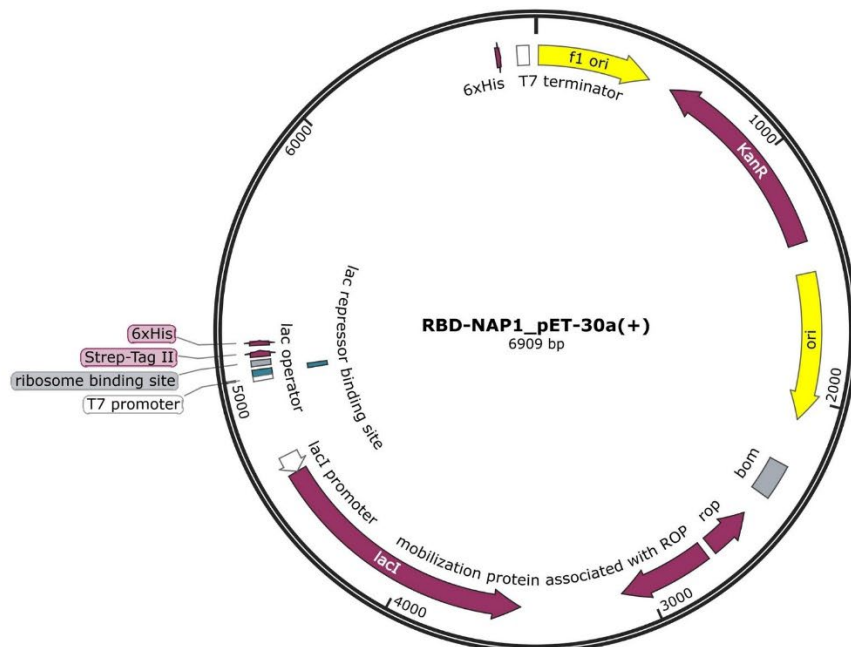




Figura 5. **Generación de RBD<sub>Nap1</sub> por síntesis de plásmidos.** A y B) Se sintetizó la secuencia correspondiente al segmento del RBD<sub>Nap1</sub>, a partir de la secuencia de aminoácidos se generó la secuencia optimizada de nucleótidos. C) Se sintetizó la secuencia de interés en el plásmido pET30a+ con la que se transformaron células BL21DE3 para la producción de las proteínas correspondientes al RBD<sub>Nap1</sub>.

El plásmido generado se utilizó para transformar células BL21 DE3, las cuales se crecieron en volúmenes de 1 litro de medio de cultivo y adquirieron por medio del plásmido resistencia a kanamicina. A partir de los lisados obtenidos se realizó la purificación de los RBD de interés por medio de columnas de afinidad. Las alícuotas obtenidas se ultrafiltraron para eliminar el imidazol presente y se corrieron en gel de SDS-Page al 10% y luego la banda de interés (Fig. 9C) fue cortada del gel y analizada por espectroscopia MS/MS en el Instituto Clodomiro Picado Twhight de la UCR, esto permitió analizar las secuencias con respecto a los aminoácidos de la toxina correspondiente (Fig. 6)

MSLVNRKQLEKMANVRFVQEDEYVAILDALAEYHNMSSENTVVEKYLKLDINSLTDIYIDTY  
 KKSGRNKALKKFKKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDY  
 NVNVFYDSNAFLINTLKKTIVESATNDTLESFRENLDPRFDYNKFYRKRMEIYDKQKNFINY  
 YKTQREENPDLIIDDIVKIYLSNEYSKDIDELNSYIEESLNKVTENSGNDVRNFEEFKGGESFK  
 LYEQELVERWNLAAAADILRISALKEVGGVYLDVDMPLGQPDLFESIEKPSSVTVDFWEMVK  
 LEAIMKYKEYIPGYTSEHFDMLEEVQSSFESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNS  
 KGIINQGLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPASEDNDFNTTTNAFIDSIMAEANADNG  
 RFMMELGKYLRVGFPPDVKTTINLSGPEAYAAAYQDLLMFKEGSMNIHLIADLRNFEISKNTI  
 SQSTEQEMASLWSFDDARAKAQFEEYKKNYFEGSLGEDDNLDFSQNTVV DKEYLLEKISSL  
 ARSSERGYIHIVQLQGDKISYEAACNLFAKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPNGDGEIQEIDK  
 YKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEFNTDIFAGLDVDSLSTEIETAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMF  
 SYSVNV EETYPGKLLL RVKDKVSELMP SISQDSIIVSANQYEV RINSEGRRELLDHSGEWINK  
 EESIIKDISKEYISFNPKENKIIVKSKNLP ELLSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLAECEINVISN  
 IDTQVVEGRIEEAKSLTSDSINYIKNEFKLIESISDALYDLKQQNELEESHFISFEDILETDEGFSI  
 RFIDKETGESIFVETEKAI FSEYANHITTEEISKIKGTIFD TVNGKLVKKNLDATHEVNTLNAAFF  
 IQSLIEYNSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDETIDLLPTLSEGL  
 PVIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTAATTAIITSSLGIASGFSILLVPLAG  
 ISAGIPSLVNNELILRDKATKVVDYF SHISLAESEGAFTSLDDKIMMPQDDL VISEIDFNNSITL  
 GKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDSLKDLMLPNAP  
 NRVFAWETGWTPGLRSLENDGTKLLDRIRDNYEGEFYWR YFAFIADALITTLKPRYEDTNR  
 NLDNTRSFIVPITTEYIREKLSYSFYGSGGTYALSLSQYNMNINIELNENDTWVIDVDNVVR  
 DVTIESDKIKKGD LIENILSKLSIEDNKIILDNHEINFSGTLN GGNGFVSLTFSILEGINAVIEVDLL  
 SKSYKVLISGELK TLMANSNSVQQKIDYIGL NSELQKNIPYSFMDDK GKENGFINCSTKEGLF  
 VSELSDVVLISKVYMDNSKPLFGYCSNDLK DVKVITKDDVIILTGYLKD DDIKLSLFTIQDENTI  
 KLVNGVYLDENGVAEILK FMNKGSTNTSDSLMSFLESMNIKSIFINSLQSNTKLILD TNFIISGT  
 T SIGQFEFICDKDNNIQPYFIK FNTLETKY TLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQK  
 YLYGIDSCVNKVIISPNIYTDEINITPIYEANNTYPEVIVLDTNYISEKINININDLSIRYVWSNDGS  
 DFI L MSTDEENKVSQVKIRFTNVFKGNTISDKISFNFSDKQDVSINKVISTFTPSYYVEGLLNY  
 DLGLISLYNEKFYINNF GMMVSGLVYINDSLYF KPPIKNLITGFTTIGDDKYFNP DNNGGAAS  
 VGETIIDGKNYYFSQNGVLQTGVFSTEDGFKYFAPADTLDENLEGEAIDFTGKLTIDENVYF  
 GDNYRAAIEWQTL DDEVYFSTDTGRAFKGLN QIGDDK FYFNSDGIMQKGFVNINDKTFYF  
 DDSGVMKSGYTEIDGKYFYFAENGEMQIGVFNTADGFKYFAH HDEDLGNEEGEALSYS GIL  
 NFNNKIYYFDDSFTAVVGWKDLEDGSKYFDEDTAEAYIGISIINDGKYYFNDSGIMQIGFVTI  
 NNEVFYFSDSGIVESGMQNIDDNYFYIDENGLVQIGVFDTSDGYKYFAPANTVNDNIYQAV  
 EYSGLVRVGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFDPETKKAYKGINVIDDIKYYFDENG  
 IMRTGLITFEDNHYYFNEDGIMQYGYLNIEDKTFYFSEDGIMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLD  
 ENFEGESINYTGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

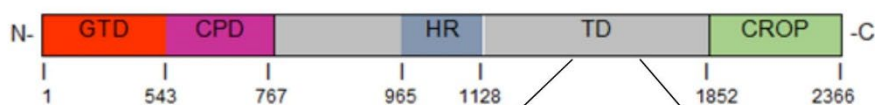
**Figura 6. Péptidos detectados en la muestra purificada de RBD<sub>Nap1</sub>, analizado por MS/MS.** La secuencia de aminoácidos corresponde a la toxina completa, el texto subrayado es el segmento del RBD y los péptidos encontrados están resaltados en amarillo y rojo, en verde se encuentran los segmentos donde se da traslape entre péptidos.

Como se observa en la figura 6, todos los segmentos detectados por el análisis proteómico se encuentran dentro de la región que corresponde con el RBD<sub>Nap1</sub>.

En el caso de la producción y purificación de la región del RBD<sub>VPI</sub>, también se generó un plásmido para transformar células eucariotas BL21 DE3, las cuales se crecieron en volúmenes de 1 litro de medio de cultivo. A partir de los lisados obtenidos se realizó la purificación de las proteínas de interés por medio de columnas de afinidad.

Las alícuotas obtenidas se ultrafiltraron para eliminar el imidazol presente y se corrieron en gel de SDS-Page al 10% y luego la banda de interés (Fig. 9C) fue cortada del gel y analizada por espectroscopia MS/MS en el Instituto Clodomiro Picado Twight de la UCR, esto permitió analizar las secuencias con respecto a los aminoácidos de la toxina correspondiente (Fig. 8)

A)



B)

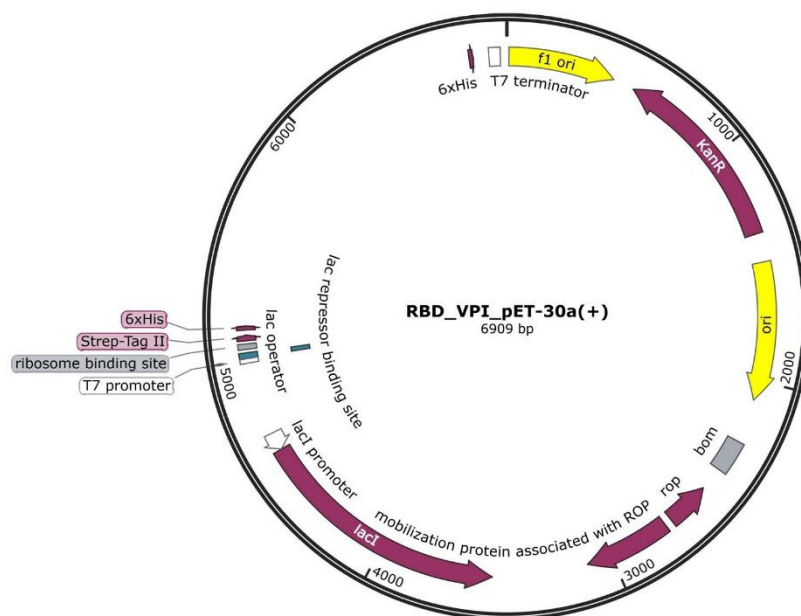
```

ATGAATTGGTCACACCCCAATTTGAAAAATCGAGCGGCTCCTCTGGCGGTCATCACCATCACCACCACGGCGGTAGCGGCGGTAGCGGCAG
CACGAATATTCGTATTAACCTGGACTCTAACACCCGTAGCTTCATCGTTCGGATTATTACGACCGAATATATCCGCGAAAAACTGAGCTACAGCT
TCTACGGTAGCGGTGGCACCTATGCACTGTCTTGTCCCAATATAACATGGGTATTAATATTGAGCTGTCTGAGAGCGACGTGGGATTATCGA
CGTTGATAACGTCGTGCGGATGTGACTATTGAATCTGACAAAATTAAGAAGGGCGATCTGATTGAAGSTATTCTCTCGAGCCTATCTATCGAG
GAAAAATAAATCATCCTGAATAGCCACGAGATCAACTTTAGTGGTGGGTTAACGGCTCCAACGGCTTCGTGTCTCTGACTTTTCCATCCTCGA
GGGTATCAACGCGATTATTGAGGTCGATCTGTTATCCAAAAGCTACAAGCTGCTTATCAGCGGAGAACTGAAGATACTGATGCTGAACAGCAAT
CATATTCAAGCAAAAAATCGATTATATTGGTTTTAACTCCGAACTGCAAAAAAATATACCGTACTCTTTCTGGGACTCAGAGGGTAAAGAAAAATGG
CTTTATCAACGCGTTCTACCAAAGAGGGTCTGTTTGTCTCCGAGCTGCCTGATGTGGTGTGATCAGCAAAGTGTATATGGATGATAGCAAACCG
AGCTTTGGTTACTACAGCAATAACCTGAAAGACGTTAAAGTAATCACCAAAGGACAACGTGAACATCTTGACCGGTTATTACCTTAAGGATGATAT
CAAGATCTCTCTGAGTTTGACCTTACAGGATGAGAAGACCAATTAAGTTGAATAGCGTTTCATCTGGACGAATCGGGCGTGGCCGAAATCTGAAA
TTTATGAATCGTAAAGGTAACACCAATACCAGCGACTCACTGATGAGCTTCTGGAGAGTATGAATTAAGTCTATCTTTGTTAATTTCTGCAA
AGCAACATCAAGTTTATCCTGGATGCGAACTTCATTATTTCCGGCACCACGAGCATCGGCCAGTTTGAATTTATTGTGATGAGAAGCAATAT
CCAACCGTACTTTCATCAAGTTCAACACTTTGGAGACGAATATACCTTATACGTTGGTAACCGTCAGAATATGATTGTGGAACCGAAATATGATCT
GGACGACAGCGGTGACATTAGCAGCACCGTTATCAACTTCAGCCAGAAGTACCTGTACGGCATCGATAGCTCGCTTAAACAGGTCGTGATCTC
CCCGAACATTTATACCGATGAGATCAACATCACCCCGTTTATGAAACCAACAACACATACCCGGAAGTGATTGTCCTGGATGCGAACTACATTA
ACGAAAAGATCAACGTGAACATTAATGACTTTGCTATCCGCTATGTTTGGAGCAATGACGGCAACGACTTTATCCTGATGAGCACCAGCGAGGA
AAACAAAGTTTCGCAAGTTAAGATCCGTTTTGTGAATGTGTTCAAAGACAAAACCCCTTGCTAACAAAGCTGTCCTTCACTTCTCGACAAGCAGG
ATGTTCCGGTTAGCGAGATCATTTTGTCCCTTACGCCAAGCTACTACT

```



C)



**Figura 7. Generación de RBD<sub>VPI</sub> por síntesis de plásmidos.** A yB) Se sintetizó la secuencia correspondiente al segmento del RBD<sub>Nap1</sub>, estos utilizaron la secuencia de aminoácidos para generar la secuencia optimizada de nucleótidos. C) Se sintetizó la secuencia de interés en el plásmido pET30a+ con la que se transformaron células BL21DE3 para la producción de las proteínas correspondientes al RBD<sub>Nap1</sub>.

En ambos casos los fragmentos detectados por espectrometría MS/MS se encuentran dentro de las secuencias de aminoácidos que corresponden a cada RBD.

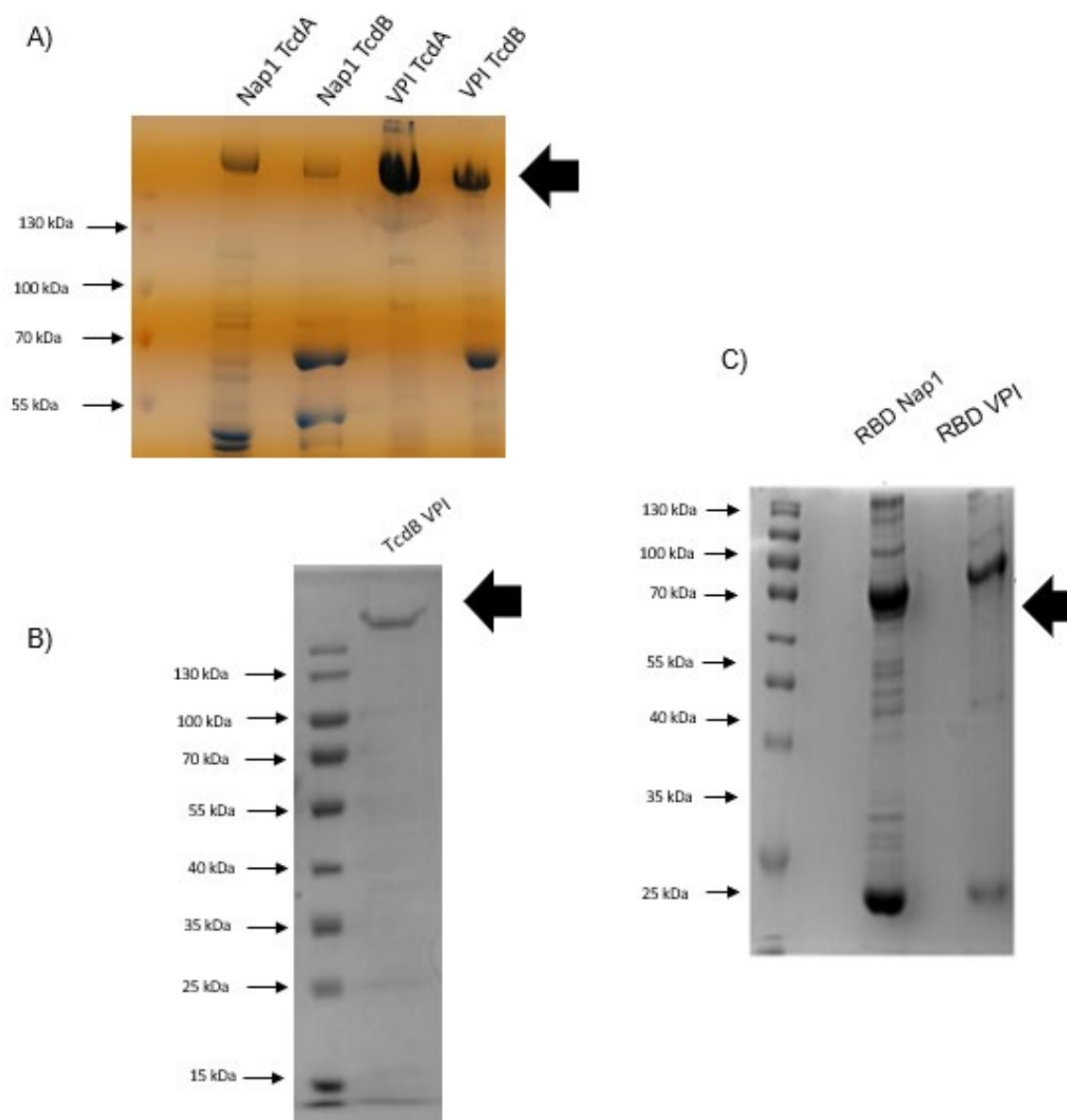
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYIDTYK  
 KSGRNKALKKFKEYLVTEVLELKNLNLTPEKLNLFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNV  
 NVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYNKFFRKRMEIYDKQKNFINYYKA  
 GREENPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDVRNFEEFKNGESFNLYEQ  
 ELVERWNLAAASDILRISALKEIGGMYLDVDMPLGQPDLFESIEKPSSTVDFWEMTKLEAIM  
 KYKEYIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNKSGIINQ  
 GLISVKDSYCSNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISEDNDNFNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMEL  
 GKYLRVGFFPDVKTINLSGPEAYAAAYQDLLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQ  
 EMASLWSFDDARAKAQFEEYKRNYFEGSLGEDDNLDFSQNIIVDKEYLLEKISSLARSSERG  
 YIHIVQLQGDKISYEAAACNLFAKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPGGEIQEIDKYKIPSIISDR  
 PKIKLTFIGHGKDEFNTDIFAGFDVDSLSTEIAAIDLAKEDISPXSIEINLLGCNMFSYSINVEET  
 YPGKLLLKVKDKISELMPSISQDSIIVSANQYEVNRINSEGRRELLDHSGEWINKEESI KDISKE  
 YISFNPKENKITVSKNLPSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEERIEE  
 AKNLTSDSINYIKDEFKLIESISDALCDLKQQNELED SHFISFEDISETDEGFSIRFINKETGESIF  
 VETEKTI FSEYANHITTEEISKIKGTIFDVTNGKLVKVNLDTTHEVNTLNAAFFIQSLIEYNSSKES  
 LSNLSVAMKVQVYAQLFSTGLNTITDAAKVVELVSTALDEIDLLPTLSEGLPIATIIDGVSLGAA  
 IKELSETSDPLL RQEIEAKIGIMAVNLTATTAITSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVL  
 RDKATKVVDFYFKHVSIVETEGVFTLLDDKIMMPQDDLVISEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGS  
 GHTVTDIDHFFSAPSITYREPHLSIYDVLEVQKEELDLSKDLMLPNAPNRVFAWETGWTPG  
 LRSLNDGT KLLDRIRDNYEGEFYWRYFAFIADALITTLKPRYEDTNIR **NLDSNTRSFIVPIITTE**  
**YIREKLSYSFYGSGGTYALSLSQYNMGINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTFIESDKIKKGDLEIGIL**  
**STLSIEENKIILNSHEINFSGEVNGSNGFVSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKILMLNS**  
**NHIQOKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEGKENGFINGSTKEGLFVSELPDVLISKVYMDDSKP**  
**SFGYYSNLLKDVKITKDNVNILTGYYLKDDIKISLSLTLQDEKTIKLSNVHLDESGVAEILKFMN**  
**RKGNLTNTSDSLMSFLESMNIKSIFVNFLQSNIKFILDANFIISGTTSIGQFEFICDENDNIQPYFIK**  
**FNTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDISSTVINFSQKLYLGIDSCVNKVVISPNIYTDEI**  
**NITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIRYVWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRF**  
**VNVFKDKTLANKLSFNFSKQDVPVSEIILSFTPSYYEDGLIGYDLGLVSLYNEKFIYINNFMM**  
 VSGLIYINDSLYYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYFNPINGGAASIGETIIDDKNYFFNQSGVLQT  
 GVFTSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIYFDDNRYGAVEWKELDGEMHYFS  
 PETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMQKGFVSINDNKHYFDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFA  
 ENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHNEEDLGNEEGEEISYSGILNFNKKIYFDDSFATAVVGWKDLE  
 DGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYYFNDDGIMQVGFVTINDKVYFSDSGIIESGVQNIDDN  
 YFYIDDNGIVQIGVFDTS DGYKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVRVGEDVYYFGETYTIETG  
 WIYDMENESDKYFNPETKKACKGINLIDDIKYYFDEKIMRTGLISFENNNYFFNENGEMQF  
 GYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINYTGWLDLDEKRYFF  
 TDEYIATGSVIIDGEEYYFDPDTAQLVISE

**Figura 8. Péptidos detectados en la muestra purificada de RBD<sub>VPI</sub>, analizado por MS/MS.** La secuencia de aminoácidos corresponde a la toxina completa, el texto subrayado es el segmento del RBD y los péptidos encontrados están resaltados en amarillo y rojo, en verde se encuentran los segmentos donde se da traslape entre péptidos.

Como se observa en la figura 8, todos los segmentos detectados por el análisis proteómico se encuentran dentro de la región que corresponde con el RBD<sub>VPI</sub>.

Todas las alícuotas purificadas y ultrafiltradas fueron cuantificadas por el método de Bradford para obtener la concentración molar de cada alícuota. Lo mismo se realizó con las toxinas utilizadas.

En el caso de las toxinas se contaba con lotes producidos en 2017, con la metodología indicada por López-Ureña, (2019), de las TcdB<sub>Nap1</sub>, TcdB<sub>Nap1v</sub> y la TcdB<sub>VPI</sub> recombinante producida a partir de *B. megaterium* (Fig. 9 A y B) y conservados a -80°C.





**Figura 9. Análisis electroforético de toxinas B y RBDs de diferentes cepas de *C. difficile* purificadas.** A) gel SDS-PAGE 7.5% TcdB<sub>VPI</sub> 10463 (270 kDa) y TcdB<sub>Nap1</sub> (270 kDa), también se observan los TcdA<sub>VPI</sub> y TcdA<sub>Nap1</sub> que no fueron usados en este trabajo. B) gel SDS- PAGE 7.5% TcdB<sub>VPI</sub>. C) gel SDS- PAGE 10% RBD<sub>VPI</sub> (62 kDa) y RBD<sub>Nap1</sub> (61 kDa).

En el caso de la TcdB<sub>VPI</sub> también se produjo un lote durante el 2021, el cual fue escalado a un volumen de 3 litros medio de cultivo. El lisado obtenido fue purificado por medio de una columna de afinidad y se analizó por medio de SDS-PAGE, para luego cortar la banda de peso esperado (Fig. 9B) y analizarla por espectroscopia MS/MS en el Instituto Clodomiro Picado Twight de la UCR, todos los péptidos detectados se compararon con la secuencia de aminoácidos correspondiente a la TcdB<sub>VPI</sub> (Fig. 10).

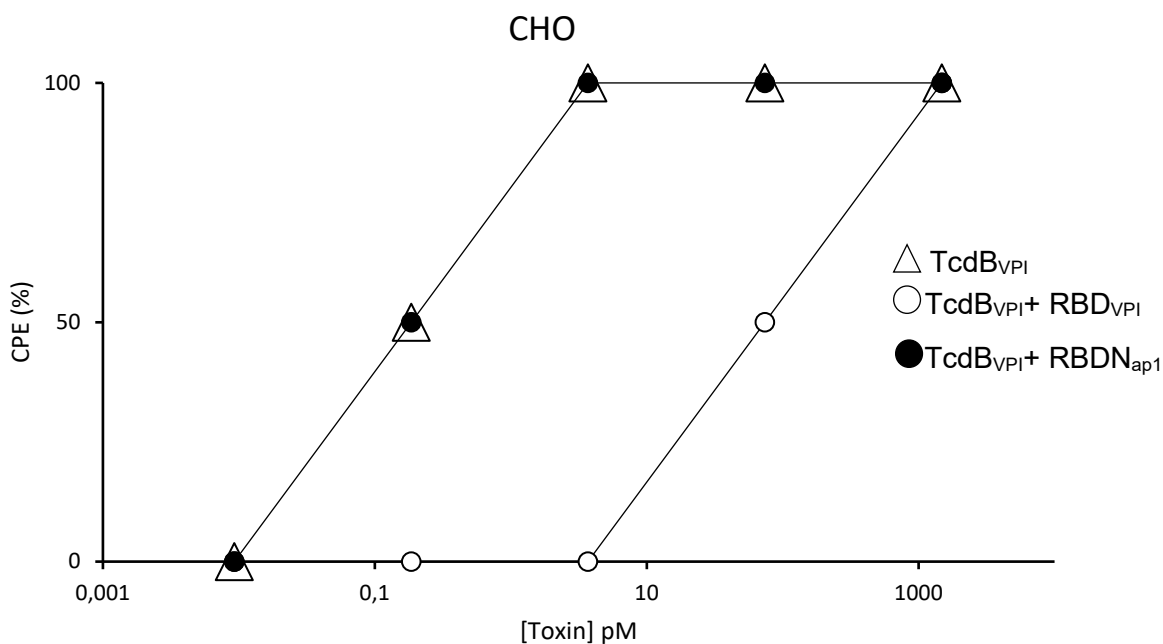
MSLVNRKQLEKMANVRFRTQEDEYVAILDALEEYHNMSENTVVEKYLKLDINSLTDIYIDTYKK  
 SGRNKALKKFKKEYLVTEVLELKNNNLTPVEKNLHFVWIGGQINDTAINYINQWKDVNSDYNVNVF  
 YDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDNPRFDYNKFFRKRMEIYDKQKNFINYYKAQREE  
 NPELIIDDIVKTYLSNEYSKEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDVRNFEEFKNGESFNLYEQELVER  
 WNLAASDILRISALKEIGGMYLVDVMDLPGIQPDLFESIEKPSSVTVDFWEMTKLEAIMKYKEYIP  
 EYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIFSSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINOGLISVKDSY  
 CSNLIVKQIENRYKILNNSLNPASEDNDFNNTTNTFIDSIMAEANADNGRFMMELGKYLRVGFPP  
 DVKTTINLSGPEAYAAAYQDLLMFKEGSMNIHLIEADLRNFEISKTNISQSTEQEMASLWSFDDA  
 RAKAQFEYKRNYPFEGSLGEDDNLDFSQNIIVVDKEYLLEKISSLARSSERGYIHYIVQLQGDKIS  
 YEAACNLFAKTPYDSVLFQKNIEDSEIAYYYPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDEF  
 NTDIFAGFDVDSLSTEIEAAIDLAKEDISPKSIEINLLGCNMFYSINVEETYPGKLLLKVVDKISEL  
 MPSISQDSIIVSANQYEVRIINSEGRRELLDHSGEWINKEESIIKDISSKEYISFNPKENKITVSKN  
 LPELSTLLQEIRNNSNSSDIELEEKVMLTECEINVISNIDTQIVEERIEEAKNLTSDSINYIKDEFKLI  
 ESISDALCDLKQQNELEDSEHIFSEFIDSETDEGFSIRFINKETGESIFVETEKTFIFSEYANHITTEIS  
 KIKGTIFDVTNGKLVKKNLDTTHEVNTLNAAFFIQSLIEYNSSKESLSNLSVAMKVQVYAQLFST  
 GLNTITDAKVVVELVSTALDETIDLLPTLSEGLPIATIIDGVSLGAAIKELSETSDPLLQRQIEAKIGI  
 MAVNLTTATTAITSSLGIASGFSILLVPLAGISAGIPSLVNNELVLRDKATKVVDYFKHVSLVETEGV  
 FTLLDDKIMMPQDDLVEIDFNNSIVLGKCEIWRMEGGSGHTVTDDIDHFFSAPSITYREPHLS  
 YDVLEVQKEELDLSKDLMVLPNAPNRVFAWETGWTPGLRSLENDGTKLLDRIRDNYEGEFYW  
 RYFAFIADALITTLKPRYEDTNIRINLDSNTRSFIVPIITTEYIREKLSYSFYGGGTYALSLSQYNM  
 GINIELSESDVWIIDVDNVVRDVTIESDKIKKGDLEIGILSTLSIEENKIILNSHEINFSGEVNGSNGF  
 VSLTFSILEGINAIEVDLLSKSYKLLISGELKLMNLNSNHIQKIDYIGFNSELQKNIPYSFVDSEGK  
 ENGFINGSTKEGLFVSELPDVLISKVYMDDSKPSFGYSSNNLKDVKVITKDNVNILTYLTKDDI  
 KISLSLTLQDEKTIKLNsvHLDESGVAEILKFMNRKGNTNTSDSLMSFLESMNIKSIQVNFQSNIK  
 FILDANFIISGTTSIGQFEFICDENDNIQPYFIKFNLTLETNYTLYVGNRQNMIVEPNYDLDDSGDIS  
 STVINFSQKLYLGIDSCVNKVVISPNIYDEINITPVYETNNTYPEVIVLDANYINEKINVNINDLSIR  
 YVWSNDGNDFILMSTSEENKVSQVKIRFVNVFKDKTLANKLSFNFSDKQDVPVSEIILSFTPSYY  
 EDGLIGYDLGLVSLYNEKFYINNFMMVSGLIYINDSLYFKPPVNNLITGFVTVGDDKYFNPIN  
 GGAASIGETIIDDKNYYFNQSGVLQTVFSTEDGFKYFAPANTLDENLEGEAIDFTGKLIIDENIY  
 YFDDNYRGAVEWKELDGEMHYFSPETGKAFKGLNQIGDYKYFNSDGMVQKGFVSINDNKHY  
 FDDSGVMKVGYTEIDGKHFYFAENGEMQIGVFNTEDGFKYFAHHNEDLGNEEGEEISYSGILNF  
 NNKIYFDDSFYAVVGVKDLLEDGSKYYFDEDTAEAYIGLSLINDGQYFNDDGIMQVGFVTINDK  
 VFYFSDSGIIESGVQNIIDNIFYIDDNGIVQIGVFDTSYGKYFAPANTVNDNIYQAVEYSGLVR  
 VGEDVYFGETYTIETGWIYDMENESDKYFNPETKACKGINLIDDIKYFDEKGIIMRTGLISFE  
 NNNYFNENGEMQFGYINIEDKMFYFGEDGVMQIGVFNTPDGFKYFAHQNTLDENFEGESINY  
 TGWLDLDEKRYFTDEYIAATGSVIIDGEEYFDPDTAQLVISE

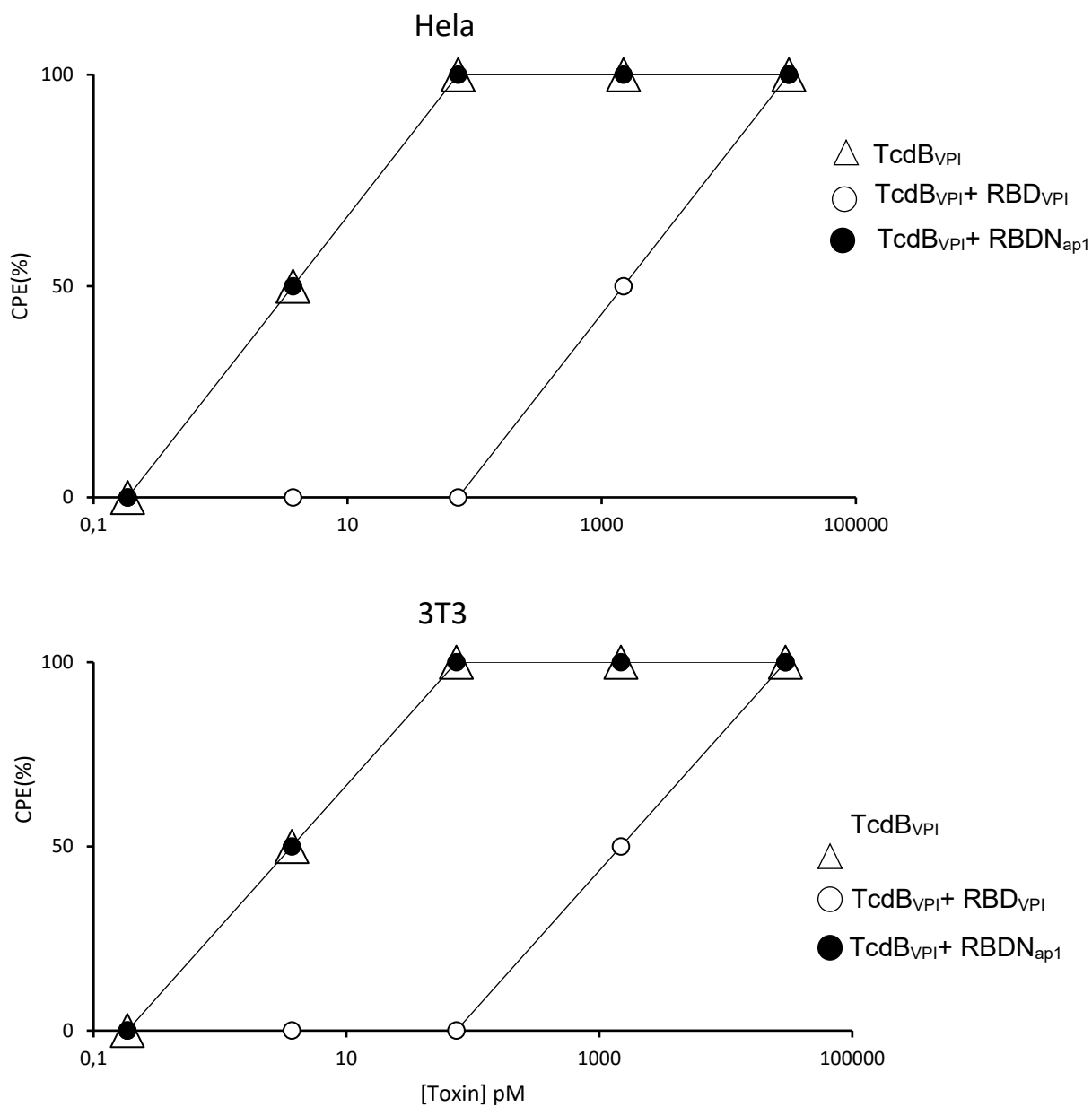
**Figura 10. Péptidos detectados en la muestra purificada de TcdB<sub>VPI</sub> recombinante, analizado por MS/MS.** Los péptidos encontrados están resaltados en amarillo y rojo, en verde se encuentran los segmentos donde se da traslape entre péptidos.

Como se observa en la figura 10, todos los segmentos detectados por el análisis proteómico se encuentran distribuidos en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la TcdB<sub>VPI</sub>.

### 4.3. Ensayos de citotoxicidad

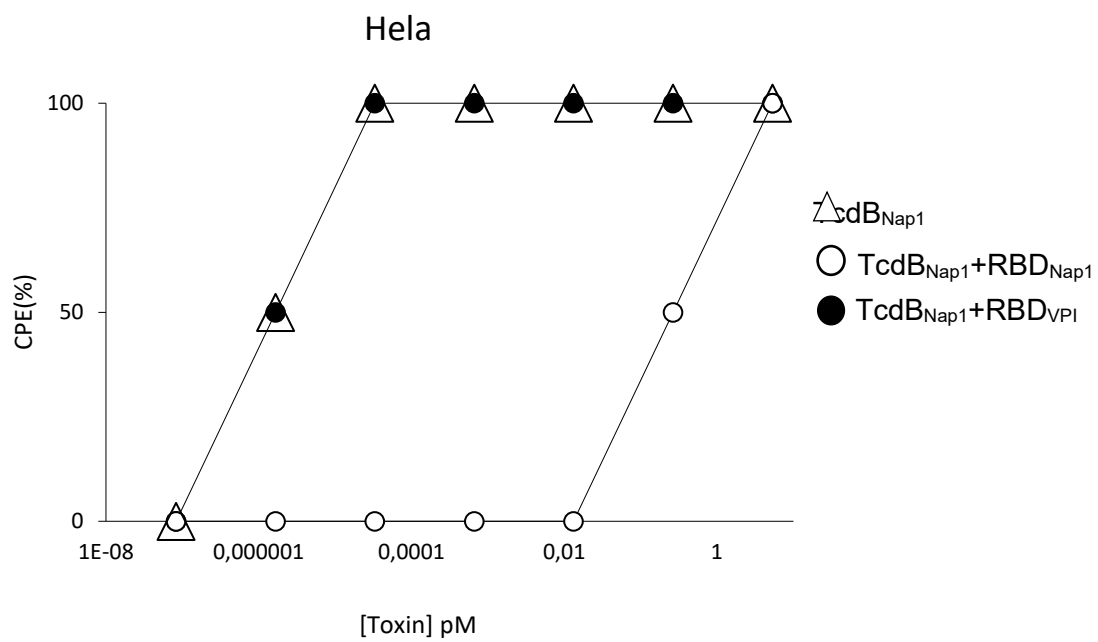
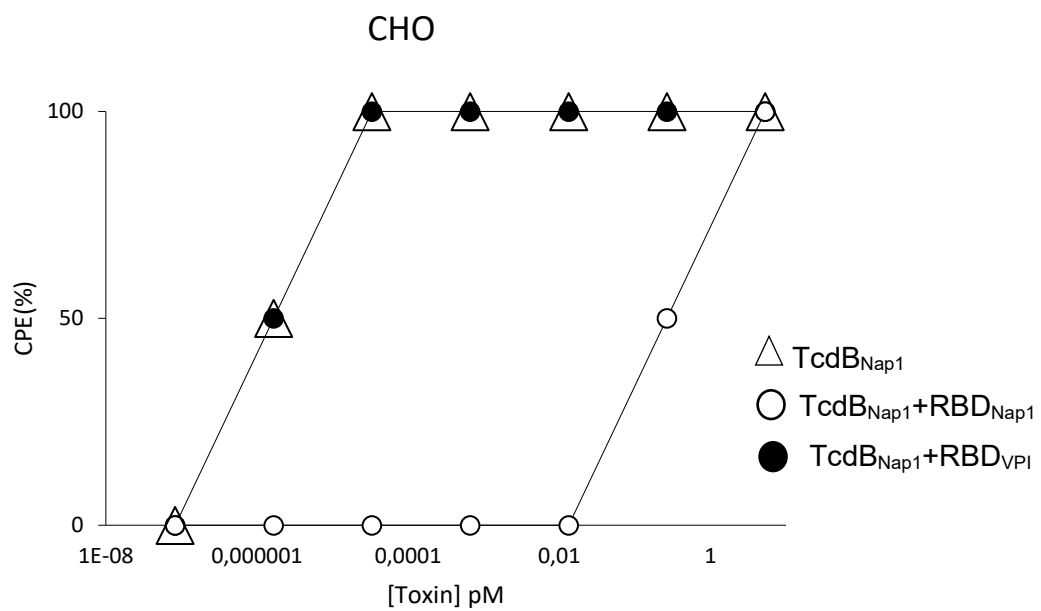
Para determinar si las toxinas B de las cepas VPI 10463 y NAP1/027 utilizan receptores diferentes se realizaron experimentos de competencia con los RBD recombinantes. Se inició ensayando el redondeo celular obtenido en diferentes líneas celulares eucariotas al aplicar cada RBD, antes de aplicar cada toxina. En todos los casos también se realizó un control aplicando solamente la toxina (Fig. 11 y 12). También se observó que la aplicación de cada RBD por sí solo no generaba ningún efecto de redondeo celular (CPE).

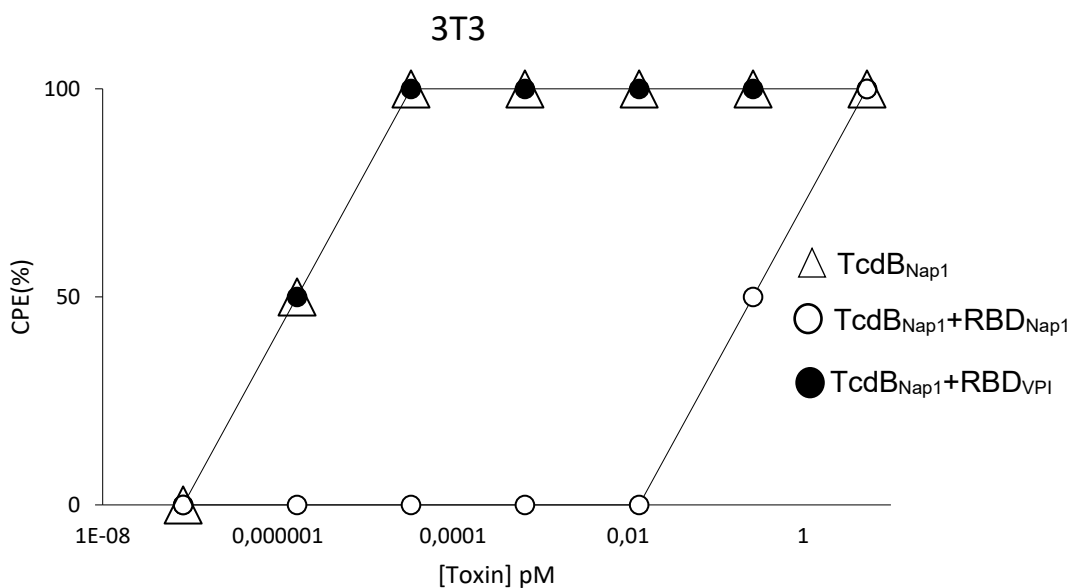




**Figura 11. Titulación de TcdB<sub>VPI</sub> en presencia de RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>NAP1</sub>, luego de 4 horas.**

Al aplicar la TcdB<sub>VPI</sub> se logran obtener un efecto similar en las cepas HeLa y 3T3.





**Figura 12. Titulación de TcdB<sub>Nap1</sub> en presencia de RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>NAP1</sub>, luego de 4 horas.**

Al aplicar la TcdB<sub>Nap1</sub> se logran obtener un efecto mayor al de la TcdB<sub>VPI</sub> sobre las mismas líneas celulares en el mismo tiempo de incubación.

Se aplicaron en las diferentes líneas celulares: CHO, Hela y 3T3, cada una de las toxinas que se habían producido TcdB<sub>VPI</sub> (cuadro 2 y 3), TcdB<sub>Nap1</sub> (cuadro 4) y TcdB<sub>Nap1v</sub> (Cuadro 5), para determinar si había un retraso en el redondeo celular al aplicar un RBD correspondiente a la toxina y si se necesitaba igual o mayor cantidad de toxina para observar el mismo efecto que en las células eucariotas a las que no se pre-incubó con ningún RBD.

Cuadro 1. Promedio de TcdB<sub>VPI</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.

Línea celular	RBD <sub>VPI</sub>	D.E.	RBD <sub>Nap1</sub>	D.E.	Sin RBD	D.E.
Hela	0,94	0,62	0,04	0,03	0,04	0,03
CHO	1,64	1,27	0,016	0,03	0,016	0,03
3T3	1.93	1,7	0,08	0,03	0,08	0,03

\*D.E.=Desviación Estándar

Cuadro 2. Promedio de TcdB<sub>Nap1</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.

Línea celular	RBD <sub>Nap1</sub>	D.E.	RBD <sub>VPI</sub>	D.E.	Sin RBD	D.E.
Hela	0,00033	4X10 <sup>4</sup>	8,4 X10 <sup>-7</sup>	1X10 <sup>6</sup>	8,4 X10 <sup>-7</sup>	1X10 <sup>6</sup>
CHO	0,00683	0,008	0,000033	0	0,000033	0
3T3	0,013	0	0,00035	4X10 <sup>4</sup>	0,00035	4X10 <sup>4</sup>

\*D.E.=Desviación Estándar

Cuadro 3. Promedio de TcdB<sub>Nap1v</sub> (pM) capaz de inducir 50% CPE en ausencia o presencia de los RBDs indicados luego de 4 horas en diferentes líneas celulares.

Línea celular	RBD <sub>Nap1</sub>	D.E.	RBD <sub>VPI</sub>	D.E.	Sin RBD	D.E.
Hela	0,0049	0	0,000106	0,0001	0,000106	1X10 <sup>3</sup>
CHO	0,002456	0,003	3,2 X10 <sup>-6</sup>	4X10 <sup>5</sup>	3,2 X10 <sup>-6</sup>	4X10 <sup>5</sup>
3T3	1,96	0	0,0049	0	0,0049	0

\*D.E.=Desviación Estándar

Con la aplicación de las diferentes toxinas se observa en todos los experimentos la utilización de una mayor cantidad de toxina en las células eucariotas que se incubaron con el RBD correspondiente a la toxina utilizada, para obtener el mismo efecto que en las células que no se incubaron con ningún RBD. De acuerdo con los resultados obtenidos las células Hela y 3T3 necesitan 24% más de la TcdB<sub>VPI</sub> para obtener resultados iguales en las células cuando se utiliza el RBD<sub>VPI</sub>, respecto a las células sin ningún RBD.

#### 4.4 Ensayos de modificación de sustrato

Para determinar si los RBD eran capaces de bloquear la unión de la TcdB de las diferentes cepas de *C. difficile* a los receptores en la superficie celular de diferentes líneas celulares eucariotas por un método independiente al anteriormente utilizado, se determinó el efecto de glicosilación de la proteína RhoA. Para este



proceso se incubaron diferentes líneas celulares con los RBDs recombinantes antes de aplicar la TcdB, se generaron lisados de las células a diferentes tiempos y se detectó la presencia de RhoA sin glicosilar por medio de Western blot. Para esta detección se utilizaron anticuerpos que detectan la proteína Rho solamente cuando se encuentra sin glicosilar.

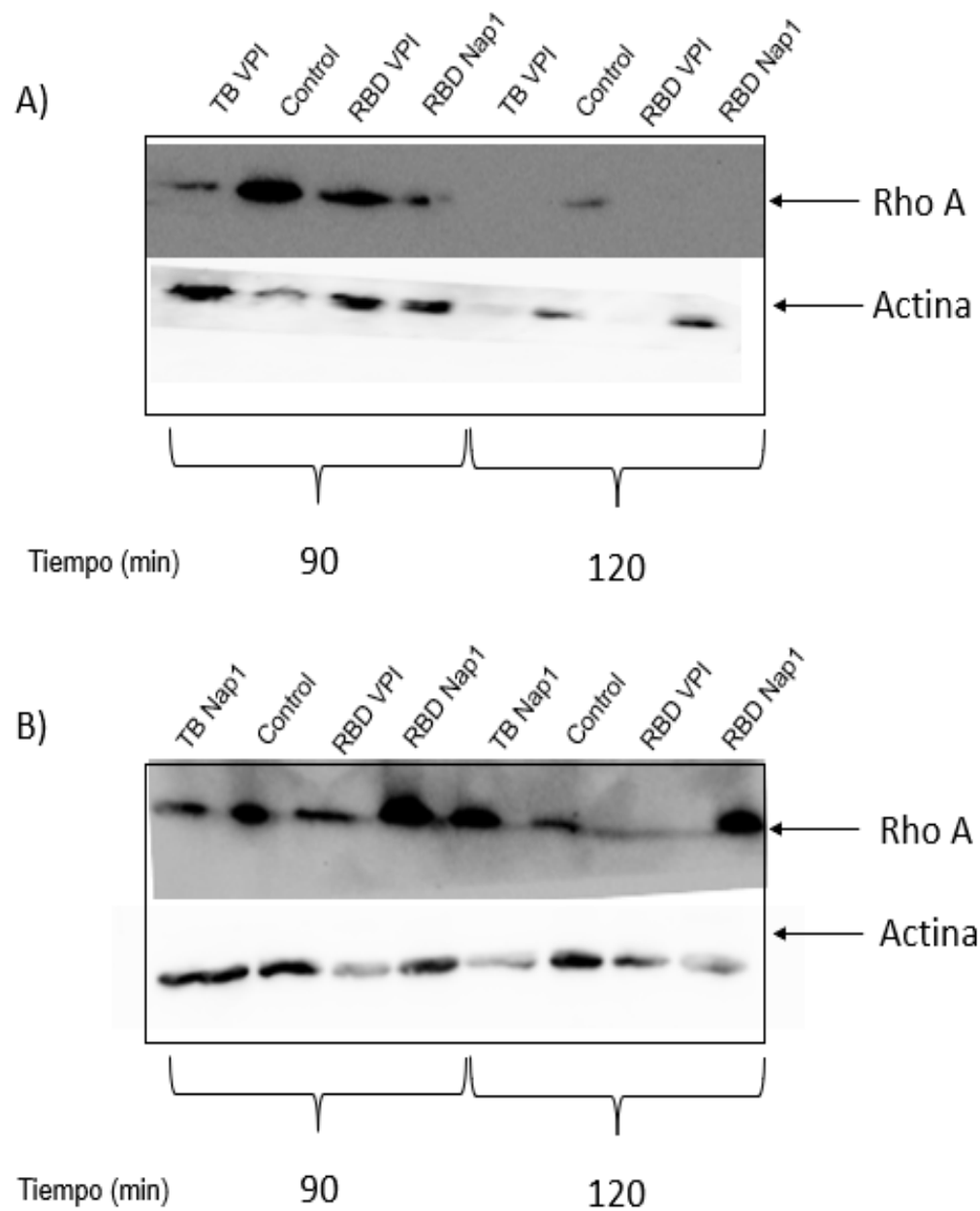
Se utilizó la línea celular 3T3 con 0.013 pM de la TcdB<sub>Nap1</sub> (Fig. 13 B), para determinar si el RBD<sub>Nap1</sub> era capaz de retrasar la glicosilación de RhoA y se utilizó la línea celular CHO con 0.009 pM de la TcdB<sub>VPI</sub>. En ambos casos se utilizó la presencia de actina como control de que cada pozo se había cargado con la muestra para realizar el Western blot.

De forma que se logra observar (Fig 13), que al aplicar uno de los TcdBs utilizados, esta entra en la célula y glicosila a la proteína RhoA, en ambos casos se logra observar la presencia de una banda al aplicar el RBD correspondiente al mismo TcdB.

También, al avanzar la incubación ese efecto de bloqueo que genera cada RBD disminuye, por lo que en ambos casos se evidencia una disminución considerable de las bandas detectadas entre los 90 y los 120 minutos. Mientras que al aplicar un RBD contrario al TcdB con el que se incubaron las células fue posible detectar una concentración menor de las proteínas RhoA, en comparación con los pozos control o en los que se aplicó un RBD que sí lograra bloquear la toxina.

Se eligió utilizar la TcdB<sub>VPI</sub> con la línea celular 3T3 y la TcdB<sub>NAP1</sub> con la línea celular CHO, debido a que cada una presenta una mayor afinidad de unión a los

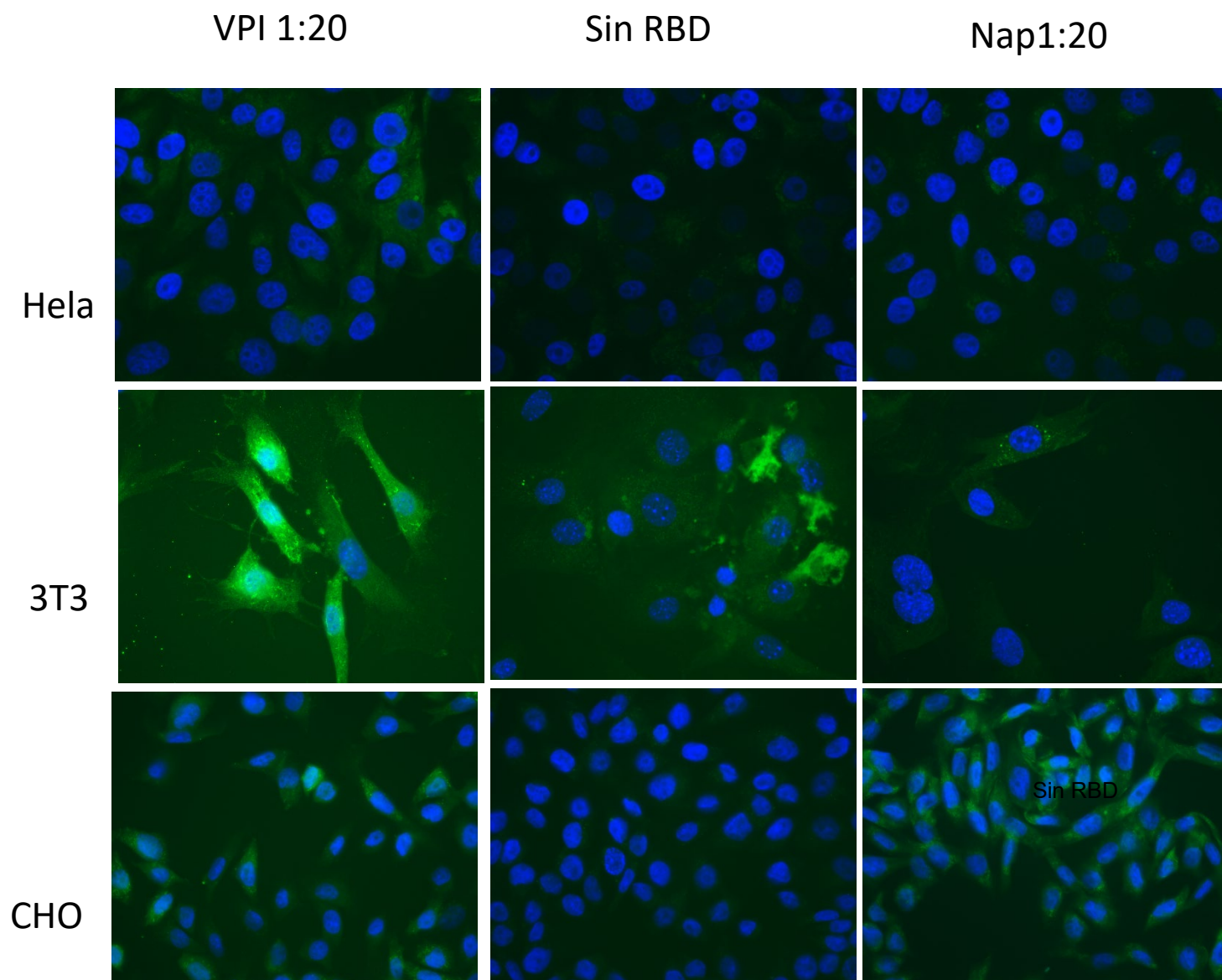
receptores en la superficie celular, de acuerdo con lo reportado por López- Ureña, (2019).



**Figura 13. Determinación de competencia entre RBD recombinantes y las respectivas toxinas mediante ensayo de glicosilación de Rho. A)** Células CHO se incubaron con RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> antes de incubarlas con 11 pM de la TcdB<sub>VPI</sub>. Posteriormente se lisaron las células y se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo que detecta la proteína RhoA, pero no su forma glicosilada. Se utilizó como control células a las que no se aplicó toxina ni RBD **B)** Células 3T3 se incubaron con RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> antes de incubarlas con 11 pM de la TcdB<sub>Nap1</sub>, para obtener lisados que fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo que detecta la proteína RhoA, pero no su forma glicosilada. Se utilizó como control células a las que no se aplicó toxina ni RBD.

#### **4.5 Marcaje fluorescente de los dominios de unión al receptor**

Para determinar un patrón de unión a las diferentes líneas celulares se aplicó cada uno de los RBD generados los cuales se unieron covalentemente a biotina y se aplicó estreptavidina unida a un fluorocromo para poder visualizar la unión a los receptores de cada línea celular. Debido a que el fluorocromo está unido a la estreptavidina y no directamente al RBD se realizaron controles para determinar el ruido de fondo de la señal fluorescente (Fig.14). De forma que fue posible determinar que existía unión de estos RBDs marcados a la superficie celular en todas las líneas celulares que se probaron y además la unión de ambos RBDs se dan de forma similar en las células Hela, pero hay un notable aumento en la unión entre el RBD<sub>VPI</sub> con los receptores de la superficie en las células 3T3 y entre el RBD<sub>Nap1</sub> con los receptores de la superficie en las células CHO.



**Figura 14. Determinación de la unión de RBDs de las toxinas B de distintas cepas de *C. difficile* a diferentes líneas celulares. Se incubaron las distintas líneas celulares con los RBD biotinilados, para revelar la unión de estos se utilizó**

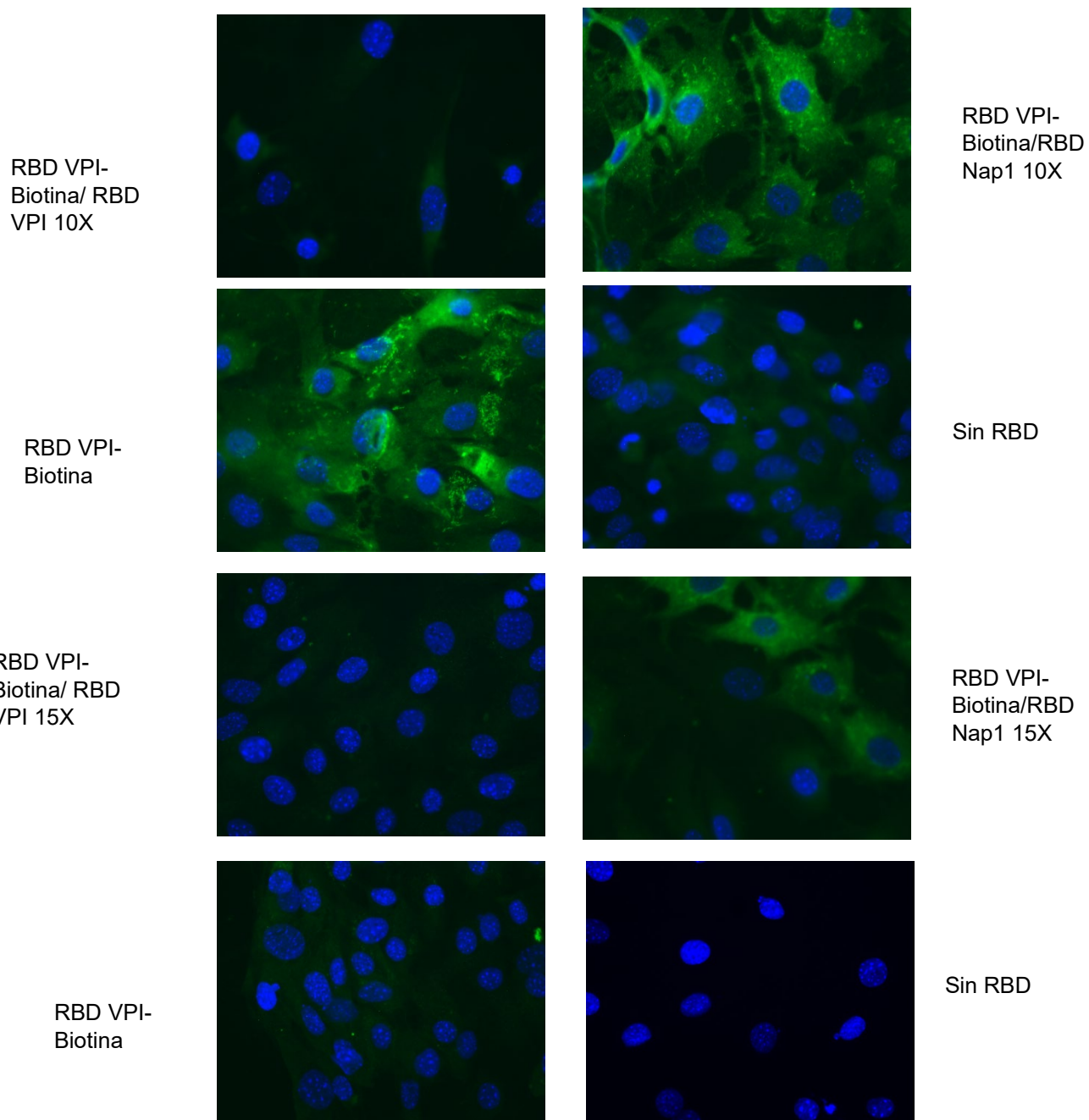
estreptavidina-Alexa Fluor 546, lo que permitió observar los RBDs que se unieron a receptores en la superficie de las células eucariotas, como fluorescencia verde, coloreada digitalmente. Los núcleos se marcaron con Hoesht que se observa con fluorescencia azul.

#### **4.6 Ensayo de especificidad de la unión a receptores**

Para determinar si el aumento de la señal fluorescente al unir cada RBD con líneas celulares, puede interpretarse como la presencia de mayor número de receptores superficiales para ese RBD, se probó la especificidad de estos receptores. Para esto, se realizaron ensayos de competencia aplicando cada RBD sin biotinar en mayores concentraciones antes de aplicar los RBD marcados para determinar si había cambios en la fluorescencia al incubar las células. En el caso de que estos RBD tuvieran preferencia por un receptor, al competir contra su mismo RBD sin marcar se debería ver una disminución significativa de la fluorescencia, lo que no ocurriría si no se tuviera una especificidad hacia los receptores en la superficie de las distintas líneas celulares.

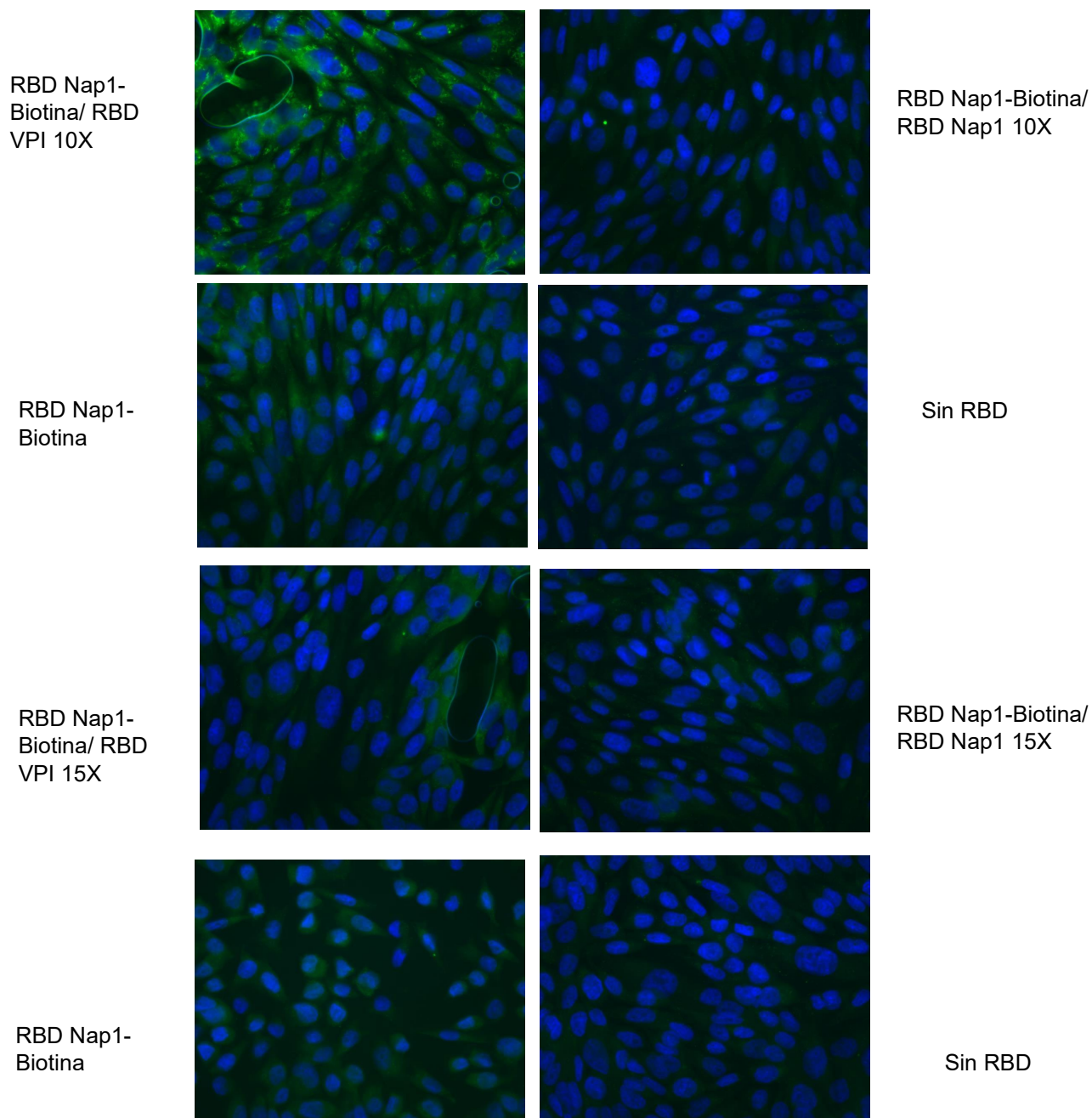
En primer lugar, se aplicó el RBD<sub>VPI</sub> en distintas concentraciones junto al RBD<sub>VPI</sub> biotinilado, en células 3T3, (Fig. 15) lo que generó una disminución evidente de la señal fluorescente, mientras que al aplicar el RBD<sub>Nap1</sub> no tuvo ningún efecto observable sobre la fluorescencia percibida. Se realizó en ambos casos controles, sin los RBDs, solo con el conjugado de estreptavidina- fluorocromo, para determinar el ruido de fondo de la señal fluorescente, debido a que el fluorocromo está unido a

la estreptavidina y no directamente al RBD y así obtener la fluorescencia por la unión del conjugado con la superficie celular.



**Figura 15. Determinación de la especificidad de la unión de los RBDs de las toxinas B de *C. difficile* en la línea células 3T3.** Se incubaron las células 3T3 con los RBD<sub>VPI</sub> biotinilados junto con concentraciones mayores de los RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> sin biotina, para revelar la especificidad de la unión de estas proteínas se utilizó Estreptavidina- Alexa Fluor 546, color verde, coloreada digitalmente, lo que permitió observar los RBDs que se unieron a receptores en la superficie de las células 3T3. Para cada concentración probada se realizó un control positivo y un control negativo independiente.

Luego se realizaron ensayos de competencia aplicando cada RBD sin biotinilar en mayores concentraciones antes de aplicar los RBD<sub>Nap1</sub> marcados para determinar si había cambios en la fluorescencia al incubar las células CHO (Fig.16), lo que generó una disminución evidente de la señal fluorescente, mientras que al aplicar el RBD<sub>VPI</sub> sin marcar, no tuvo ningún efecto observable sobre la fluorescencia percibida, en ninguna de las dos concentraciones que se probaron. Se realizó en ambos casos controles para determinar el ruido de fondo de la señal fluorescente, debido a que el fluorocromo esta unido a la estreptavidina y no directamente al RBD.



**Figura 16. Determinación de la especificidad de la unión de los RBDs de las toxinas B de *C. difficile* en la línea células CHO. Se incubaron las células CHO**



con los RBD<sub>Nap1</sub> biotinilados con concentraciones mayores de los RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> sin biotina, para revelar la especificidad de la unión de estas proteínas se utilizó Estreptavidina- Alexa Fluor 546, color verde, coloreada digitalmente, lo que permitió observar los RBDs que se unieron a receptores en la superficie de las células CHO. Para cada concentración probada se realizó un control negativo y un control positivo independiente.

En ambos experimentos (Fig. 15 y 16) se pierde la señal fluorescente al aplicar RBD biotinilado en competencia con el RBD de la misma cepa, lo que no ocurre en ninguna de las concentraciones probadas al aplicar el otro RBD.

## 5. Discusión

La hipótesis que se manejó durante este trabajo es que la TcdB<sub>Nap1</sub> de *C. difficile* utiliza receptores distintos o adicionales a los de la TcdB<sub>VPI</sub> para ingresar a la célula y empezar el proceso de intoxicación. Para poder realizar metodologías que confirmaran o descartaran esta hipótesis se empezó por generar los RBDs ya que al tener solo este segmento de cada toxina resulto sumamente útil para desarrollar distintas metodologías planteadas, donde se podía trabajar directamente con los receptores en distintas líneas celulares eucariotas.

Obtener altas cantidades de una proteína específica directamente de fuentes nativas a menudo es un desafío. Para superar este obstáculo se suele aprovechar los sistemas de expresión heterólogos clonando genes en vectores artificiales diseñados para operar dentro de células fácilmente cultivables, como *Escherichia coli*, que suele ser la primera opción para la expresión de muchas proteínas heterólogas debido al vasto conocimiento sobre su genética, bioquímica y biología molecular. Dentro de las ventajas de emplear este tipo de vectores están que las manipulaciones genéticas son sencillas, los cultivos se obtienen de manera fácil y económica, y muchas proteínas extrañas son bien toleradas y pueden expresarse en niveles altos (Kielkopf *et al.*, 2021).

Para realizar la recombinación de vectores se amplificó directamente la secuencia nucleotídica original de *C. difficile*, para luego ser introducida sin alteraciones en *E. coli* para producir cada proteína. En este escenario los RBDs esperados no pudieron ser detectados por Western blot al finalizar cada purificación. Caso contrario la síntesis de plásmidos, generó cada RBD esperado a partir de una secuencia

optimizada. Sin embargo, los codones que la originaban eran distintos por lo que el obtener o no los RBDs no dependía de su plegamiento sino de la transcripción de sus respectivos codones para generar estos dominios. Como lo indica Hia y Takeuchi (2020), el código genético tiene 61 codones que generan 20 aminoácidos diferentes, por lo que hay distintos codones que actúan como sinónimos para generar el mismo aminoácido. Debido a que las mutaciones sinónimas no afectan la identidad del aminoácido codificado, originalmente se pensó que no tenían consecuencias para la función de la proteína o la aptitud de cada organismo. Sin embargo, el análisis de secuencia comparativa reveló una distribución no aleatoria de codones sinónimos en genes de diferentes organismos. Cada organismo parece preferir un conjunto diferente de codones sobre otros; que se conoce como sesgo de codón (Quax et al., 2015). Por lo que estos codones sinónimos no son completamente equivalentes y existen diferencias en la frecuencia de los codones que confieren diferentes tasas de traducción y, generan una presión de selección para mantener ciertas proporciones entre los codones sinónimos, (Hia y Takeuchi, 2020).

De forma que, los codones óptimos se decodifican más rápido y de manera más eficiente que sus contrapartes no óptimas, lo que afecta la eficiencia de traducción de las transcripciones. Como la eficiencia de la traducción es modulada por la composición de codones de la transcripción, las transcripciones enriquecidas con codones óptimos se traducen de manera más eficiente que las enriquecidas con codones no óptimos (Hia y Takeuchi, 2020). Cada una de las razones anteriores

podrían explicar que no se logró obtener las proteínas esperadas al utilizar la secuencia original de *C. difficile* directamente en *E. coli*.

Desde una perspectiva económica, el sintetizar un plásmido de *novo* requiere una alta inversión económica. Dicho costo podría ser justificable al comparar en el caso de la recombinación de vectores, el tiempo utilizado, los reactivos, equipo y mano de obra calificada podría tener un costo mayor.

Se considera exitosa la obtención de ambos RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> ya que en ambos casos se logra que las proteínas obtenidas mimifiquen el dominio nativo de cada proteína al ser funcionales y unirse a los receptores en la superficie de diferentes líneas celulares.

Al generar ambos RBDs por medio de la síntesis de plásmidos no se logró una purificación completamente efectiva ya que se obtuvieron distintas bandas en los geles de agarosa al 10% pero la banda de mayor intensidad en todos los casos se encontró sobre el marcador de 55 kDa, lo que corresponde con el tamaño esperado de cada proteína, 62 kDa para el RBD<sub>VPI</sub> y 61 kDa para el RBD<sub>Nap1</sub>.

De igual forma se puede afirmar que estos RBDs producidos presentan una actividad biológica compatible con los RBD de las toxinas B completos ya que por sí mismos no generan un proceso de intoxicación, pero sí son capaces de competir contra su propia toxina completa. La competencia de estos RBD contra su propia toxina se evidencia durante el retraso en el redondeo de las diferentes líneas celulares durante los ensayos de citotoxicidad y también al generar un retraso en el proceso de glicosilación de RhoA. En ambos casos se evidenció que este efecto de

bloqueo de los receptores se presenta al utilizar cada RBD contra su toxina completa correspondiente pero no ocurre al utilizar la toxina completa de la otra cepa.

También este efecto de cada RBD sobre su toxina se evidencia en la detención temporal que ocurre en la glicosilación de la GTPasa monomérica Rho A, lo que determina un claro retraso en el ingreso de la toxina a la célula. Estos RBD eventualmente se desligan a los receptores de la superficie celular ya que se logra la entrada de la toxina en la célula, lo que genera la glicosilación de las proteínas Rho, que dejan de ser detectadas por el anticuerpo. Esto indica que los RBDs utilizados únicamente generan un retraso en el proceso de unión de su toxina correspondiente y no un bloqueo permanente de los receptores en la superficie celular. De acuerdo con Schorch *et al.*, (2014) el segmento de unión a receptores de superficie de distintas toxinas glicosilantes de varias especies de clostridios, tienen la capacidad de generar endocitosis en las células a las que se unen, lo que podría explicar el eventual inicio de la intoxicación observado en los experimentos de este trabajo.

También fue posible demostrar la unión de estos RBD generados con la superficie de distintas líneas celulares, al marcarlos con biotina. Durante los distintos ensayos se evidenció una constancia en los resultados con controles negativos donde la ausencia del RBD genera un cambio evidente en la fluorescencia que se detecta con respecto a los controles positivos que incluyen RBDs biotinilados de cualquiera de las dos cepas utilizadas.

De igual forma durante los ensayos de fluorescencia fue posible detectar una diferencia en la sensibilidad de la unión de los RBD<sub>VPI</sub> y RBD<sub>Nap1</sub> generados que coincide con lo descrito por López-Ureña (2019), en cuanto a la sensibilidad de las toxinas B correspondientes de cada cepa de *C. difficile*. De forma que fue evidente lo indicado por López-Ureña (2019), que la TcdB<sub>VPI</sub> es capaz de generar redondeo celular de forma más eficiente en células 3T3, ya que de acuerdo con lo observado en este trabajo se da una mayor unión de los RBD<sub>Nap1</sub> a la línea celular CHO y la unión de los RBD<sub>VPI</sub> a la línea celular 3T3. Lo que no se logra observar en la línea celular Hela, ya que ambos RBDs parecen tener una sensibilidad similar a los receptores en la superficie de estas células.

Como se mencionó en párrafos anteriores cada uno de los RBDs utilizados presenta un efecto competitivo sobre su propia toxina, pero no sobre la otra, esto se evidencia en los ensayos de citotoxicidad donde hay un evidente retraso en el redondeo celular que ocurre en todas las líneas celulares utilizadas.

Todas las evidencias obtenidas ayudan a confirmar que la TcdB<sub>Nap1</sub> utiliza receptores adicionales o completamente distintos a los que utiliza la TcdB<sub>VPI</sub>. De hecho, en ambos casos se obtienen resultados similares a los controles que no utilizan RBD del todo, de forma que estos no están interfiriendo con el proceso de intoxicación al utilizar toxinas distintas al RBD. Incluso se necesita aplicar concentraciones mayores de la toxina correspondiente al RBD utilizado para obtener porcentajes de redondeo similares a los del experimento control, esto es aplicable a ambas toxinas B y todas las líneas celulares utilizadas, debido a que la

toxina debe competir con cada RBD para poder unirse a los receptores en la superficie celular.

También fue posible asociar la sensibilidad de cada línea celular con respecto a la cantidad de receptores en la superficie celular como se mencionó anteriormente la línea celular CHO es más sensible a la TcdB<sub>Nap1</sub> y parece relacionarse con una mayor cantidad de receptores a nivel de su superficie, como se observó al aplicar los RBD<sub>Nap1</sub> con biotina- estreptavidina -Alexa Fluor 546. También se evidencia una cantidad mucho menor de receptores que se unen a los RBD<sub>VPI</sub> en esta línea celular. Caso contrario ocurre en la línea celular 3T3 que parece tener mayor número de receptores en su superficie para los RBD<sub>VPI</sub>. Como se ha evidenciado en el trabajo de Pan *et al.*, (2021), las diferentes líneas celulares presentan diferentes niveles de expresión de CSPG4 y FZD en la superficie celular.

Se ha probado que la TcdB de la cepas hipervirulentas no reconoce las proteínas Frizzled, por el remplazo de una cisteína 2232 por una tirosina en la secuencia de la toxina, como si ocurre con la TcdB VPI (Chung et al., 2018). De forma que se podrían asociar los resultados obtenidos en este trabajo con el uso de receptores adicionales para el ingreso en la célula de las toxinas de ambas cepas.

Lo cual coincide con lo expuesto por Chen et al., (2021), que demostraron que tanto las cepas virulentas como hipervirulentas utilizan el receptor CSPG4 para ingresar en células intestinales de ratones. Aunque a diferencia de las proteínas Frizzled, los homólogos CSPG4 están menos conservados entre los distintos

animales. Por ejemplo, la identidad de la secuencia primaria entre CSPG4 humano y Cspg4 de hámster es solo del 84,5%. Por lo que las toxinas pueden tener diferentes afinidades hacia CSPG4 de diferentes animales, como es el caso de CHO y 3T3, se derivaron de diferentes fuentes animales (Pan, *et al.*, 2021).

También se ha presentado al receptor TFPI como uno de los receptores utilizados por las cepas hipervirulentas de *C. difficile* para ingresar a las células (Lou et al, 2022), mientras que se ha demostrado que la toxina clásica también utiliza el receptor PVRL3, para ingresar a las células (LaFrance, *et al.*, 2015).



## 6. Conclusiones

En conclusión, se diseñaron los RBD<sub>Nap1</sub> y RBD<sub>VPI</sub> con la estrategia de síntesis de plásmidos que generó los dominios que se esperaba estructuralmente. Estos dominios se comportan biológicamente con las características esperadas de un RBD.

De igual forma se logró confirmar la hipótesis que la TcdB<sub>Nap1</sub> de *C. difficile* utiliza receptores distintos o adicionales a los utilizados por la TcdB<sub>VPI</sub> para su unión a la célula blanco y posterior efecto citopático.

Estos RBD podrían utilizarse para continuar comprendiendo el proceso de intoxicación de las toxinas TcdB en distintas líneas celulares. Además, se puede llevar a cabo la unión de estos a tejidos para poder determinar si existe un patrón de unión e intensidad a diferentes tipos de células.

También se podrían clonar estos RBDs directamente unidos a una GFP o a una peroxidasa para facilitar su uso en ensayos como ELISA o Western blot, además de la detección en tejidos.

## 7. Referencias

Awad M, Johanesen P, Carter G, Rose E, Lyras D. 2014. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 5:579–593.

Carter G, Chakravorty A, Nguyen T, Mileto S, Schreiber F, Li L, Howarth P, Clare S, Cunningham B, Sambol S, Cheknis A, Figueroa I, Johnson S, Gerding D, Rood J, Dougan G, Lawley T, Lyras D. 2015. Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. *MBio* 6:1–10.

Chen P, Tao L, Wang T, Zhang J, He A, Lam K, Liu Z, He X, Perry K, Dong M, Jin R. 2018. Structural basis for recognition of frizzled proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Science* 360:664 LP – 669.

Chen P., Jin, R., 2021. Receptor binding mechanisms of *Clostridioides difficile* toxin B and implications for therapeutics development. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*.

Chen S, Sun C, Wang H, Wang J. 2015. The role of Rho GTPases in toxicity of *Clostridium difficile* toxins. *Toxins (Basel)* 7:5254–5267.

Chen, P., Ji Z., Zheng L., Hatim T., Siyu W., Songhai T., Jie Z., Liang T., Gutierrez, C., Li X., Gerhard, R., Lan H., Min D., Rongsheng J. 2021. “Structural Basis for CSPG4 as a Receptor for TcdB and a Therapeutic Target in *Clostridioides Difficile* Infection.” *Nature Communications* 12(1).

Chung SY, Schöttelndreier D, Tatge H, Fühner V, Hust M, Beer LA, Gerhard R. 2018. The conserved Cys-2232 in *Clostridioides difficile* toxin B modulates receptor binding. *Front Microbiol* 9: 2314-2325.

Connor, J. R. O., Johnson, S., & Gerding, D. N. 2009. *Clostridium difficile* Infection Caused by the Epidemic BI/NAP1/027 Strain. *YGAST* 136(6): 1913–1924.

Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A. 2016. *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins*, 8(5), 1–25.

Elliott, B., Dingle, K., Didelot, X., Crook, D., Riley, T. 2014. The Complexity and Diversity of the Pathogenicity Locus in *Clostridium difficile* Clade 5, *Genome Biology and Evolution*, 6 (12): 3159–3170

Etzaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C., Alonso, M. T., & Ostolaza, H. 2019. Irreversible versus repairable membrane poration: differences in permeabilization elicited by Bordetella Adenylate Cyclase Toxin and its hemolysin domain in macrophages. *FEBS Journal*, 287(9), 1798–1815.

Gerhard R, Nottrott S, Schoentaube J, Tatge H, Olling A, Just I. 2008. Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Med Microbiol* 57:765-70.

Guh, A. Y., Mu, Y., Winston, L. G., Johnston, H., Olson, D., Farley, M. M., Wilson, L.E., Holzbauer, S.M., Phipps, E.C., Dumyati, G.K., Beldavs, Z.G., Kainer, M.A., Karlsson, M., Gerding, D.N., McDonald, L. C. 2020. Trends in U.S. Burden of *clostridioides difficile* infection and outcomes. *New England Journal of Medicine*, 382(14), 1320–1330.

Hernández Del Pino, R., Barbero, A., Español, L., Morro, L., Pasquinelli, V., 2021. “The Adaptive Immune Response to *Clostridioides Difficile*: A Tricky Balance between Immunoprotection and Immunopathogenesis.” *Journal of Leukocyte Biology* 109(1),195–210.

Hia, F., Takeuchi, O., 2021. “The Effects of Codon Bias and Optimality on mRNA and Protein Regulation.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 78(5):1909–1928.

Janezic S., Rupnik M. 2010. Molecular Typing Methods for *Clostridium difficile*: Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR Ribotyping. In: Mullany P., Roberts A.P. (eds) *Clostridium difficile*. Methods in Molecular Biology™, Humana Press, 646.

Khoruts, A., Staley, C., Sadowsky, M., 2020. Faecal microbiota transplantation for *Clostridioides difficile*: mechanisms and pharmacology *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18: 67–80.

Kielkopf, L., Bauer, W., Urbatsch, L., (2021). Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification, and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc*.

Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN, McDonald LC. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 46:431–437.

LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin DH, Lacy DB. 2015. Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 112 (22):7073–7078.

Lanis JM, Barua S, Ballard JD. 2010. Variations in Tcdb activity and the hypervirulence of emerging strains of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog* 6:65–66.

Lanis, J.M.; Hightower, L.D.; Shen, A.; Ballard, J.D. 2012. TcdB from hypervirulent *Clostridium difficile* exhibits increased efficiency of autoprocessing: Autoproteolysis of TcdBHIST and TcdBHV. *Mol. Microbiol*, 84:66–76.

Lim, S., Stuart, R., Mackin, K., Carter, G., Kotsanas, D., Francis, M., Easton, M., Dimovski, K., Elliott, B., Riley, T., Hogg, G., Paul, E., Korman, T., Seemann, T., Stinear, T., Lyras, D., Jenkin, G. 2014. Emergence of a Ribotype 244 Strain of *Clostridium difficile* Associated with Severe Disease and Related to the Epidemic Ribotype 027 Strain, *Clinical Infectious Diseases*, 58 (12): 1723–1730.

López-Ureña D, Orozco-Aguilar J, Chaves-Madrigal Y, Ramírez-Mata A, Villalobos-Jimenez A, Ost S, Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Papatheodorou P, Chaves-Olarte E. 2019. Toxin B Variants from *Clostridium difficile* Strains VPI 10463 and NAP1/027 Share Similar Substrate Profile and Cellular Intoxication Kinetics but Use Different Host Cell Entry Factors. *Toxins* 11 (6):348-363.

Luo, J., Yang, Q., Zhang, X., Zhang, Y., Wan, L., Zhan, X., Zhou, Y., He, L., Li, D., Jin, D., Zhen, Y., Huang, J., Li, Y., Tao, L. 2022. TFPI is a colonic crypt receptor for TcdB from hypervirulent clade 2 *C. difficile*, *Cell*, 185 (6):980-994.e15

Naggie S, Miller BA, Zuzak KB, Pence BW, Mayo AJ, Nicholson BP, Kutty PK, McDonald LC, Woods CW. 2011. A case-control study of community associated

*Clostridium difficile* infection: no role for proton pump inhibitors. *Am J Med* 124:276 e1-7.

Pan Z, Zhang Y, Luo J, Li D, Zhou Y, He L, Yang, Q., Dong, M., Tao, L. 2021. Functional analyses of epidemic *Clostridioides difficile* toxin B variants reveal their divergence in utilizing receptors and inducing pathology. *PLoS Pathog* 17(1): e1009197.

Purcell EB, Mckee RW, Courson DS, Garrett EM, McBride SM, Cheney RE. 2017. *Clostridium difficile* Biofilm and Toxin Production during Stationary Phase. *Infect Immun* 85: e00347-17.

Quax, T., Claassens, N., Soll, D., van der Oost, J., 2015. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol Cell*; 59(2): 149–161.

Quesada-Gómez C, López-Ureña D, Acuña-Amador L, Villalobos-Zúñiga M, Du T, Freire R, Guzmán-Verri C, Gamboa-Coronado MDM, Lawley TD, Moreno E, Mulvey MR, Brito GADC, Rodríguez-Cavallini E, Rodríguez C, Chaves-Olarte E. 2015. Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. *J Clin Microbiol* 53:1216 –1226.

Rupnik M, Janezic S. 2016. An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. *J Clin Microbiol* 54:13–18.

Rupnik M. 2008. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol Rev* 32:541–555.

Schorch, B., Song, S., van Diemen, F., Bock, H., May, P., Herz, J., Brummelkamp, T., Papatheodorou, P., Aktories, A., 2014. LRP1 is a receptor for

*Clostridium perfringens* TpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins. PNAS, 111 (17): 6431–6436

Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T., Sebahia, M., Quail, M., Rose, G., Gerding, D., Gibert, M., Popoff, M., Parkhill, J., Dougan, G., Wren, B. W. 2009. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provide insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology* 10(9): 1–15.

Tian JH, Glenn G, Flyer D, Zhou B, Liu Y, Sullivan E, Wu H, Cummings JF, Ellingsworth L, Smith G. 2017. *Clostridium difficile* chimeric toxin receptor binding domain vaccine induced protection against different strains in active and passive challenge models. *Vaccine* 35:4079–4087.

# Anexos



### Anexo 1. Cuantificación de RBDs utilizados

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración Molar ( $\mu\text{M}$ )
RBD <sub>Nap1</sub> del 14/12/20	2103,63	33,9
RBD <sub>Nap1</sub> del 11/01/21	3550,21	57,30
RBD <sub>Nap1</sub> del 22/01/21	9396,68	151,65
RBD <sub>Nap1</sub> del 01/02/21	4122,82	66,54
RBD <sub>Nap1</sub> del 09/02/21- 1	3533,61	57,03
RBD <sub>Nap1</sub> del 09/02/21-2	3811,62	61,52
RBD <sub>Nap1</sub> del 17/02/21 -1	4093,78	66,07
RBD <sub>Nap1</sub> del 17/02/21-2	3878,01	62,59
RBD <sub>Nap1</sub> del 08/06/21	1498,55	24,19
RBD <sub>Nap1</sub> del 16/06/21	3767,27	60,80
RBD <sub>Nap1</sub> del 23/06/21	2974,96	48,01
RBD <sub>Nap1</sub> del 29/06/21	3699,04	59,70
RBD <sub>VPI</sub> del 14/12/20	2374,95	38,7
RBD <sub>VPI</sub> del 11/01/21	3014,94	48,60
RBD <sub>VPI</sub> del 22/01/21	8081,33	130,27
RBD <sub>VPI</sub> del 01/02/21	2214,11	35,69
RBD <sub>VPI</sub> del 09/02/21- 1	3525,31	56,83
RBD <sub>VPI</sub> del 09/02/21-2	4019,09	64,79
RBD <sub>VPI</sub> del 17/02/21 -1	3313,69	53,42

RBD <sub>VPI</sub> del 17/02/21-2	3861,41	62,24
RBD <sub>VPI</sub> del 08/06/21	1187,01	19,13
RBD <sub>VPI</sub> del 16/06/21	1561,91	25,18
RBD <sub>VPI</sub> del 23/06/21	2717,89	43,81
RBD <sub>VPI</sub> del 29/06/21	3510,52	56,59

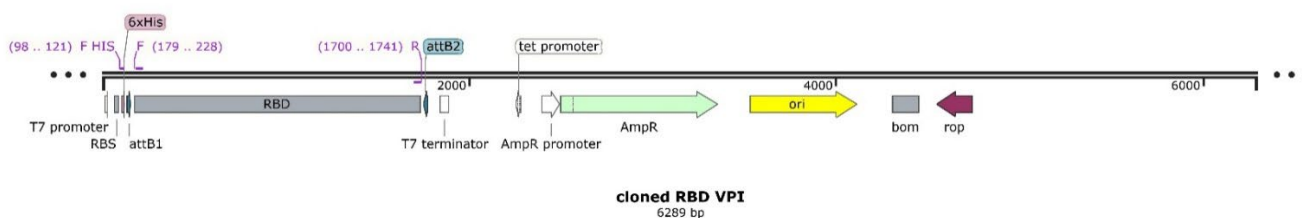
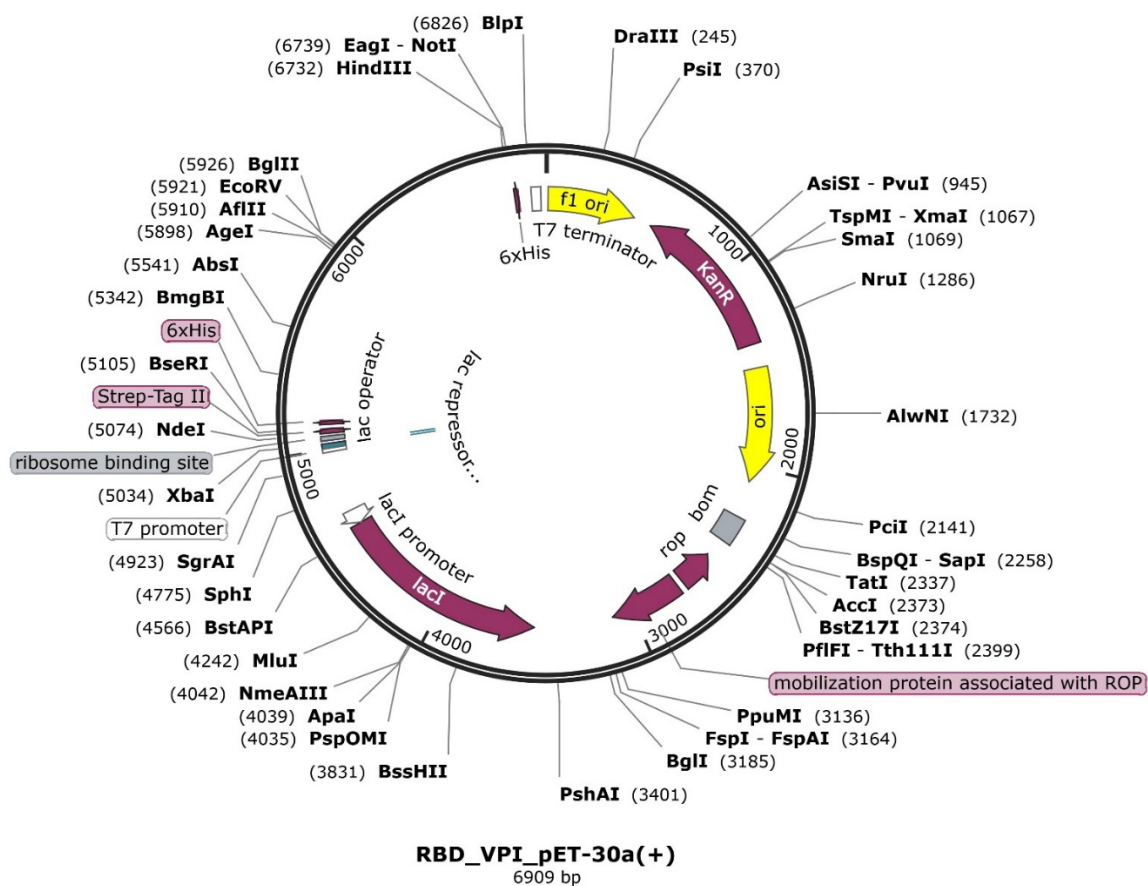
**Anexo 2. Secuencia optimizada utilizada para la síntesis del plásmido del****RBD<sub>VPI</sub>**

ATGAATTGGTCACACCCCAATTTGAAAAATCGAGCGGCTCCTCTGGCGGTC  
ATCACCATCACCACCACGGCGGTAGCGGCGGTAGCGGCAGCACGAATATTC  
GTATTAACCTTGGACTCTAACACCCGTAGCTTCATCGTTCCGATTATTACGACC  
GAATATATCCGCGAAAACTGAGCTACAGCTTCTACGGTAGCGGTGGCACCT  
ATGCACTGTCCTTGTCCCAATATAACATGGGTATTAATATTGAGCTGTCTGAGA  
GCGACGTGTGGATTATCGACGTTGATAACGTCGTGCGCGATGTGACTATTGA  
ATCTGACAAAATTAAGAAGGGCGATCTGATTGAAGGTATTCTCTCGACGCTAT  
CTATCGAGGAAAA

TAAAATCATCCTGAATAGCCACGAGATCAACTTTAGTGGTGAGGTTAACGGCT  
CCAACGGCTTCGTGTCTCTGACTTTTTCCATCCTCGAGGGTATCAACGCGATT  
ATTGAGGTCGATCTGTTATCCAAAAGCTACAAGCTGCTTATCAGCGGAGA  
GAAGATACTGATGCTGAACAGCAATCATATTCAGCAGAAAATCGATTATATTG  
GTTTTAACTCCGAACTGCAAAAAAATATACCGTACTCTTTCGTGGACTCAGAG  
GGTAAAGAAAATGGCTTTATCAACGGTTCTACCAAGAGGGTCTGTTTGTCTC  
CGAGCTGCCTGATGTGGTGTGATCAGCAAAGTGTATATGGATGATAGCAAAC  
CGAGCTTTGGTTACTACAGCAATAACCTGAAAGACGTTAAAGTAATCACCAAG  
GACAACGTGAACATCTTGACCGGTTATTACCTTAAGGATGATATCAAGATCTC  
TCTGAGTTTGACCTTACAGGATGAGAAGACCATTAAGTTGAATAGCGTTCATC  
TGGACGAATCGGGCGTGGCCGAAATTCTGAAATTCATGAATCGTAAAGGTAA  
CACCAATACCAGCGACTCACTGATGAGCTTCTGGAGAGTATGAATATTAAGT  
CTATCTTTGTTAATTTCTGCAAAGCAACATCAAGTTTATCCTGGATGCGAACT

TCATTATTTCCGGCACCACGAGCATCGGCCAGTTTGAATTTATTTGTGATGAG  
AACGACAATATCCAACCGTACTTCATCAAGTTCAACACTTTGGAGACGAATTAT  
ACCTTATACGTTGGTAACCGTCAGAATATGATTGTGGAACCGAATTATGATCT  
GGACGACAGCGGTGACATTAGCAGCACCGTTATCAACTTCAGCCAGAAGTAC  
CTGTACGGCATCGATAGCTGCGTTAACAAGGTCGTGATCTCCCCGAACATTTA  
TACCGATGAGATCAACATCACCCCGGTTTATGAAACCAACAACACATACCCGG  
AAGTGATTGTCCTGGATGCGAACTACATTAACGAAAAGATCAACGTGAACATT  
AATGACTTGTCTATCCGCTATGTTTGGAGCAATGACGGCAACGACTTTATCCT  
GATGAGCACCCAGCGAGGAAAACAAAGTTTCGCAAGTTAAGATCCGTTTTGTGA  
ATGTGTTCAAAGACAAAACCCTTGCTAACAAGCTGTCCTTCAACTTCTCGGAC  
AAGCAGGATGTTCCGGTTAGCGAGATCATTTTGTCTTCACGCCAAGCTACTA  
C

### Anexo 3. Mapa del plásmido utilizado para generar la proteína RBD<sub>VPI</sub>



**Anexo 4. Secuencia optimizada utilizada para la síntesis del plásmido del****RBD<sub>Nap1</sub>**

ATGAATTGGTCACACCCCAATTTGAAAAAGCTCCGGCAGCAGCGGCGGTC  
ATCACCACCACCACCATGGTGGTAGCGGCGGTAGCGGCTCTACCAACATCCG  
TATTAACCTGGACAGCAATACCCGTAGCTTCATTGTTCCGGTGATCACCACCG  
AATATATCCGCGAGAAGCTATCTTACAGCTTCTATGGAAGCGGGGGCACGTA  
CGCGCTGAGCCTGTCCCAATATAACATGAACATTAACATTGAGTTAAACGAGA  
ATGACACCTGGGTTATCGACGTTGACAACGTGGTTCGTGATGTCACCATTGAG  
AGCGATAAAATCAAGAAAGGTGATTTAATTGAGAACATTCTGTGCAAATTAAGC  
ATCGAAGACAA

CAAGATCATCCTGGACAACCATGAAATCAACTTTAGCGGCACTCTGAACGGTG  
GTAATGGCTTTGTTTCTCTGACCTTCTCTATTTTGGAGGGTATCAACGCTGTGA  
TTGAGGTTGATTTGCTGTCCAAATCATAAAAGTGCTGATCTCCGGTGAACCTG  
AAACCTTGATGGCCAACCTCTAACAGCGTGCAGCAGAAGATTGATTATATTGG  
TCTGAACTCCGAACTGCAAAAAAATATCCCGTATAGCTTCATGGATGACAAAG  
GCAAAGAGAATGGCTTTATCAATTGTTCCACGAAAGAAGGTTTGTTCGTGAGC  
GAGTTGAGCGACGTCGTGCTGATCTCGAAAGTGTATATGGACAACAGTAAAC  
CGCTGTTTG

GTTACTGCAGCAATGACCTGAAGGACGTGAAGGTTATCACCAAGGATGATGT  
AATTATCCTGACGGGTTACTATTTGAAGGACGACATCAAGATCTCCCTTTCGTT  
CACCATCCAAGACGAAAACACCATTAAGCTGAATGGCGTTTACCTGGATGAGA  
ACGGTGTTGCAGAAATCCTGAAGTTCATGAACAAAAAGGGTTCGACGAACAC  
CAGCGATAGCCTGATGAGCTTCCTGGAAAGCATGAATATCAAGTCCATTTTA

TTAACTCACTTCAAAGCAACACCAAGCTGATTTTGGACACCAACTTCATCATCA  
GCGGCACCACCAGCATCGGCCAGTTTGAGTTCATCTGCGATAAGGACAACAA  
CATTGAGCCGTATTTTATCAAATTCAACACCTTGGAGACAAAATATACCCTCTA  
CGTGGGTAATCGTCAGAATATGATTGTGGAACCGAATTATGATTTGGACGACT  
CAGGTGATATTTCTAGTACGGTGATAAACTTCTCTCAGAAATACCTGTACGGC  
ATTGATAGCTGCGTGAATAAAGTCATCATCTCTCCGAATATCTACACTGATGA  
GATCAACATTACTCCGATTTATGAAGCGAATAATACTTACCCGGAAGTCATTGT  
CCTGGATACCAACTACATTAGCGAGAAAATTAACATTAACATCAACGATCTCA  
GTATTCGTTATGTTTGGTCAAACGACGGCAGCGATTTTATCCTGATGAGCACC  
GATGAGGAAAATAAGGTAAGCCAAGTTAAAATTCGCTTTACGAATGTTTTTAAA  
GGCAACACGATTTCTGACAAGATCTCGTTCAATTTCTCCGACAAGCAGGACGT  
TTCCATCAACAAGGTGATTTCTACCTTCACCCCAAGCTACTAC

## Anexo 5. Mapa del plásmido utilizado para generar la proteína RBD<sub>NAP1</sub>.

