

Expresión episomal de toxina de pertussis genéticamente inactivada en *Bordetella pertussis*

Ernesto Marcos, Karen Marrero, Edith Suzarte, Lourdes L. Proenza, Beatriz Ferrán, Celso Pérez y Javier Campos.

Departamento de Biología Molecular, División de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ernesto.marcos@cigb.edu.cu

Recibido: 8 de junio de 2009.

Aceptado: 23 de septiembre de 2009.

Palabras clave: toxina de pertussis, vacunas acelulares, tos ferina, *Bordetella pertussis*.
Key words: pertussis toxin, acellular vaccines, Whooping cough, *Bordetella pertussis*.

RESUMEN. *Bordetella pertussis* es una bacteria Gram negativa, la cual constituye el agente etiológico de la tos ferina. La enfermedad se desencadena por el efecto conjunto de una serie de factores de virulencia expresados por la bacteria, los cuales se encuentran regulados por el sistema *bvg*. Uno de los factores de virulencia más importantes es la toxina de *pertussis*, razón por la cual, se emplea de forma inactivada como el componente principal de las vacunas acelulares contra la enfermedad. La toxina de *pertussis* posee una estructura del tipo A-B compuesta por seis polipéptidos codificados en un operón único. El polipéptido S1 constituye la subunidad enzimáticamente activa, la cual cataliza la transferencia de ADP-ribosa del NAD a la subunidad α de las proteínas G en células eucariotas, lo cual genera una serie de efectos biológicos dentro de los que se incluye: sensibilización a histamina, incremento de la secreción de insulina y efectos inmunoestimuladores e inmunosupresores. El presente trabajo describe los procedimientos realizados para la obtención de cepas de *Bordetella pertussis* productoras de elevadas concentraciones de toxina pertúsica atenuada genéticamente. Para esto, se realizaron las sustituciones aminoacídicas Arg9 por Lys y Glu129 por Gly de la subunidad S1. El operón de la toxina de *pertussis* mutada se clonó en un vector de amplio rango de hospedero bajo la regulación de un promotor de expresión temprana (*phaB*). Los clones obtenidos pudieran ser empleados como sistemas de expresión para producción de vacunas acelulares en Cuba.

ABSTRACT. The Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis* is the etiologic agent of Whooping cough. The disease is caused by the effect of an array of virulence factors expressed by the bacterium, which are controlled by the *bvg* system. One of the most important virulence factors is the *pertussis* toxin, for this reason its inactivated form is used as the main component of acellular vaccines. *Pertussis* toxin has six polypeptides encoded in a single operon, forming an A-B structure. The S1 polypeptide is the enzymatically active subunit, which catalyzes the ADP-ribose transference from NAD to the α subunits of the G proteins in eucariotic cells, triggering some biological effects such as histamine sensitization, enhancement of insulin and both suppressive and stimulatory immunologic effects. The present study deals with the procedure for generating *Bordetella pertussis* strains that express high levels of genetically inactivated pertussis toxin. For this purpose the aminoacids Arg9 and Glu129 was replaced by Lys and Gly, respectively, in the subunit S1. The mutant pertussis toxin operon was cloned into a wide host-range vector, regulated by an early promoter (*phaB*). The resulting clones could be used as expression systems for the production of acellular vaccines in Cuba.

INTRODUCCIÓN

La tos ferina es una enfermedad humana del tracto respiratorio, causada por el cocobacilo Gram negativo *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*). La enfermedad puede ser prevenida por vacunas de bacterias inactivadas o por vacunas acelulares,¹ sin embargo, los estudios enfocados a la comparación de la eficacia de diferentes vacunas acelulares en niños, mostraron que estas tienen mayor eficacia absoluta y reacciones adversas más leves que las vacunas de células completas licenciadas por Estados Unidos.²⁻⁵ Todas las vacunas acelulares incluidas en estos estudios contienen la toxina de pertussis (PT) inactivada como componente principal, incluyendo otros antígenos como hemaglutinina filamentososa (FHA), fimbria serotipo específica y pertactina.³⁻⁵

La toxina de pertussis (PT) es una proteína con actividad ADP-ribosiltransferasa, la cual es sintetizada y secretada exclusivamente por *B. pertussis*. Posee una estructura del tipo A-B compuesta por seis polipéptidos, los cuales están codificados en un operón único (*Optx*) en el orden S1, S2, S4, S5 y S3. El polipéptido S1 constituye la subunidad A de la toxina, mientras que la subunidad B está constituida por los polipéptidos S2, S3, S4 y S5 ensamblados en una proporción 1 : 1 : 2 : 1.⁶⁻⁸ El polipéptido S1 constituye la subunidad enzimáticamente activa de la PT, la cual se encuentra asentada bloqueando el orificio del anillo formado por el oligómero B.^{9,10} Todas las subunidades se unen por interacciones no covalentes. La subunidad B se une a la membrana de las células eucariotas e incrementa la eficiencia de entrada de la

subunidad A.⁹ Una vez en el citosol de la célula hospedera, la subunidad B une ATP y causa la liberación de la subunidad A, la cual se vuelve activa luego de reducir sus puentes disulfuro.¹¹

Basado en estudios de caracterización *in vitro* de PT, la subunidad S1 en su forma reducida ha mostrado que cataliza la transferencia de ADP-ribosa del NAD a la subunidad α de las proteínas G en células eucariotas.⁹ Los efectos biológicos atribuidos a la interrupción de las rutas de señalización afectadas por la inactivación de las proteínas G incluyen: sensibilización a histamina, incremento de la secreción de insulina en respuesta a señales reguladoras y efectos inmunoestimuladores e inmunosupresores.^{9,12}

La expresión de la mayoría de los factores de virulencia de *B. pertussis* se encuentra controlada por el sistema *bvg*. En respuesta a señales inductoras conocidas como *Bvg*⁺ o fase virulenta, se activa la transcripción de los genes activados por *bvg*.¹³ Por otra parte, la exposición a ciertos factores llamados moduladores, los cuales incluyen MgSO₄, ácido nicotínico y baja temperatura, inducen la transición a la fase *Bvg*⁻, conocida como modulación fenotípica.¹⁴ Sin embargo, el sistema *bvg* incluye niveles de expresión intermedios entre los estados *Bvg*⁺ y *Bvg*⁻, conocida como fase *Bvg*ⁱ.¹⁵

Entre los genes regulados por *bvg* no todos los promotores son activados de la misma manera. Los promotores que han sido llamados promotores tempranos, de los cuales el promotor de la FHA es el ejemplo clásico, son expresados rápidamente luego de producirse un cambio a condiciones no moduladoras. Por otra parte, los promotores tardíos, dentro de los cuales se incluye el promotor de PT, toman mayor tiempo en ser expresados al encontrarse la célula en el estadio *Bvg*⁺.¹⁴

Actualmente, se emplean métodos químicos y genéticos para la destoxificación de PT para su uso en vacunas contra la tos ferina. Sin embargo, debido a que los métodos químicos pueden rendir productos con actividad tóxica residual, se han empleado alternativas de inactivación genética que resultan más seguras y económicas para el desarrollo de vacunas.¹⁶ Muchas variantes han sido empleadas hasta la fecha, la mayoría de las cuales sustituye o elimina aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de la subunidad S1. De esta forma, se reduce la actividad tóxica sin afectar las propiedades inmunogénicas y protectoras de PT.¹⁷

Uno de los toxoides más promisorios para la producción de vacunas, descrito y caracterizado en 1990 por Nencioni y cols.,¹⁸ fue el doble mutante Arg9 por Lys y Glu129 por Gly. Este mutante es empleado en la fabricación de la vacuna Acelluvax™ DTP, la cual ha probado mayor eficacia y seguridad que las variantes de células completas y otras que emplean PT químicamente destoxificada.¹⁹

El objetivo del presente estudio fue obtener elevadas cantidades de PT inactivada genéticamente para su posible empleo en vacunas acelulares en Cuba. Para esto se construyó el doble mutante Arg9 por Lys y Glu129 por Gly y se clonó bajo la regulación del promotor temprano *fhaB* en un vector de amplio rango de hospedero, para su expresión de forma extracromosomal en *B. pertussis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivo utilizados

La cepa de *E. coli* JM109 [*recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *thi*, Δ (*lac-proAB*)] se utilizó como hospedero durante las clonaciones en los vectores pUC19, pGEM y pMMB67EH. La cepa *E. coli* SM10 λ pir

(*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu* (λ pirR6K), Km^r) se usó como cepa donadora en los experimentos de conjugación con *B. pertussis*. La cepa de *B. pertussis* B0085 (mutante Δ Optx derivado de *Tohama*, construido por Rino Pappuoli y suministrado por F.R. Mooi) se empleó como cepa receptora en los experimentos de conjugación y la cepa *B. pertussis* 509 se empleó para producir PT tipo salvaje.

Se utilizaron los medios de cultivo LB (triptona, 1 %; extracto de levadura, 0,5 %; y cloruro de sodio, 1 %), Bordet-Gengou (BG) (proteosa peptona, 1 %; extracto de papa, 0,45 %; cloruro de sodio, 0,55 %; glicerol, 1 %; agar, 1,6 % y sangre de carnero desfibrinada, 15 %). Para preparar LB sólido se añadió agar al 1,5 %. Cuando fue necesario los medios se suplementaron con los antibióticos ampicilina (Ap) a 100 μ g/mL, kanamicina (Kn) a 50 μ g/mL y estreptomycin (Str) a 100 μ g/mL. Los componentes del medio LB fueron suministrados por Oxoid (Reino Unido) y el medio BG fue suministrado por BioCen (Cuba).

Aislamiento, purificación de ADN y transformación bacteriana

El aislamiento de ADN genómico de *B. pertussis* se realizó según el método de Ausubel y col.²⁰ y la purificación de ADN plasmídico mediante el Sistema Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System de Promega. La separación del ADN en geles de agarosa fue hecha según Sambrook y col.²¹ y la purificación de fragmentos de ADN a partir de estos, se realizó con el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega según las recomendaciones del fabricante. Las cepas de *E. coli* fueron transformadas con ADN plasmídico mediante electroporación según Dower y col.²²

Clonaje del operón *Optx* y la región flanqueante 5' de *fhaB*

Se amplificó por PCR un fragmento de 3,5 kb, que contenía al *Optx*, a partir del ADN cromosómico de la cepa *Tohama* de *B. pertussis*, utilizando los cebadores PT1 (5'-GGCGGATCCAGATGATCGTGCCGT-3') y PT6 (5'-GTGCCGGAACAGAAGCTTGTAGC-3') que hibridan con las regiones flanqueantes 5' y 3' del operón respectivamente. En la secuencia del cebador 3' se adicionó un sitio *Hind*III y en la del 5' se mantuvo un sitio *Kpn*I ya existente para facilitar la clonación posterior del fragmento en el plasmidio pUC19. El producto de PCR obtenido fue clonado *Kpn*I/*Hind*III en el plasmidio pUC19, luego el ligamiento fue electroporado en células de *E. coli* JM109 que se sembraron en placas de LB suplementadas con (Ap) para seleccionar los transformantes y obtener el plasmidio pUC-Optx.

La banda de 1,4 kb que contiene el flanqueante 5' de *fhaB*, se amplificó a partir del ADN cromosómico de la cepa *Tohama* de *B. pertussis*, utilizando los cebadores FHA1 (5'-CGTGGGGTACCGCAGCACTTTC-3') y FHA3 (5'-GTGCCGGAACAGAAGCTTGTAGC-3') que hibridan con las regiones flanqueantes 5' y 3' de la secuencia a amplificar respectivamente. En la secuencia del cebador 3' se adicionó un sitio *Nde*I para facilitar la posterior clonación del fragmento.

Mutagénesis dirigida de la subunidad S1 de PT

Para la sustitución de Arg9 por Lys se realizaron dos PCR por independiente a partir del ADN cromosómico de la cepa *Tohama* de *B. pertussis* con las parejas de cebadores PT7 (5'-GGGGGTACCCATATGCGTTGCACTCGGGCA-3')/07-760 (5'-CGGGCGGGAGTCA-

TACTTGTATACGGTGGCGGG -3') y PT8 (5'-CTGTT-CAATTACCGGAGTTG-3')/07-759 (5'-CCCGCCACCG-TATACAAGTATGACTCCCGCCCG -3'). En la secuencia del cebador PT7 se adicionó un sitio *KpnI* y tres bases a continuación, un sitio *NdeI* para facilitar la clonación posterior del fragmento y la inserción del promotor de *fhaB*. Se realizó un segundo PCR a partir de cantidades equimolares de los productos de las dos reacciones iniciales, utilizando la pareja de cebadores PT7/PT8. El producto de este PCR es una banda de 1 kb que contiene la subunidad S1 de PT con la mutación Arg9 por Lys.

La sustitución de Glu129 por Gly se realizó de forma similar a la de Arg9 por Lys empleando como molde la banda de 1 kb obtenida en la reacción anterior, con las parejas de cebadores PT7/08-1050 (5'- CCGGTGTGC-CAGATACCCGCTCTGGTAGGTGGC -3') y PT8/08-1049 (5'- GCCACCTACCAGAGCGGGTATCTGGCACACCGG -3'). Se realizó un segundo PCR a partir de cantidades equimolares de los productos de las dos reacciones anteriores, utilizando la pareja de cebadores PT7/PT8. El producto de este PCR es una banda de 1 kb que contiene la subunidad S1 de PT con la mutación Arg9 por Lys y Glu129 por Gly.

Este fragmento que contiene las dos mutaciones fue sustituido en el operón *Optx* utilizando las enzimas *KpnI* y *XbaI* en el plasmidio pUC-*Optx*, luego fue electroporado en células de *E. coli* JM109 que se sembraron en placas de LB suplementadas con Ap para seleccionar los transformantes y obtener el plasmidio pUC-*Optx*-Mut.

Construcción del plasmidio de amplio rango de hospedero pMM-fha-*Optx*-Mut

La inserción del flanqueante 5' de *fhaB* en el pUC-*Optx*-Mut se realizó con un ligamiento *KpnI/NdeI*, con lo que se obtuvo el plasmidio pUC-fha-*Optx*-Mut, el cual contiene al *Optx* regulado por el promotor de *fhaB*. El fragmento *fhaB-Optx* se extrajo del plasmidio pUC-fha-*Optx*-Mut con las enzimas *EcoRI/HindIII* y se ligó en iguales sitios del vector de amplio rango de hospedero pMMB67EH, lo que originó el plasmidio pMM-fha-*Optx*-Mut. Este se introdujo por electroporación en las células de *E. coli* SM10λ*pir*. Para la secuenciación del vector se contrataron los servicios de Macrogen (Korea del Sur).

Conjugación bacteriana

El plasmidio pMM-fha-*Optx*-Mut se introdujo en *B. pertussis* B0085 mediante conjugación, a partir de la incubación de una mezcla de la cepa donante SM10λ*pir* (pMM-fha-*Optx*-Mut) y la receptora (*B. pertussis* B0085) (1 : 1) en placas BG suplementadas con 10 mmol/L de MgCl₂ y 20 mmol/L de MgSO₄. Los transformantes resultantes se seleccionaron en placas de BG suplementadas con 20 mmol/L de MgSO₄, Ap y Str. La presencia del plasmidio en las células resultantes se comprobó mediante la purificación del ADN plasmídico y su posterior chequeo de restricción. Las cepas de *B. pertussis* B0085 transformadas con el plasmidio se les llamó B0085PT.

Expresión de PT en medio BG

Para la expresión de PT, las células fueron sembradas en placas BG suplementadas con los antibióticos de selección correspondientes a cada cepa. Las placas se incubaron durante 48 h a 35 °C en ambiente de humedad. La biomasa se recogió con asa microbiológica y se resuspendió en PBS-T (100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L K₂HPO₄, Tween-20 al 0,1 %, pH 7,2) la densidad óptica (DO) final a 600 nm se ajustó a

10. Las suspensiones celulares se inactivaron mediante incubación en baño húmedo a 56 °C durante 30 min .

Detección y cuantificación de PT

La presencia de PT en las suspensiones celulares fue determinada por un sistema de ELISA (del inglés, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de captura. Estos ensayos fueron estandarizados y realizados en el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM) de Holanda.

Las placas de poliestireno de 96 pozos (NUNC) se recubrieron con 100 μL/pozo de disolución estabilizadora de recubrimiento (Na₂CO₃ 0,1 mol/L, pH 9,4) la cual contenía 0,04 mg/mL de fetuina y se incubaron 1 h a 37 °C . El bloqueo de las placas se realizó con 150 μL/pozo de leche descremada al 2 % en disolución estabilizadora de recubrimiento durante 1 h a 37 °C, tras lo cual se lavaron tres veces con PBS-T. Se procedió a evaluar diluciones dobles del antígeno en PBS-T añadiendo 100 μL/pozo y partiendo de una dilución inicial de 1/2. Para la curva patrón se empleó una disolución de PT (NIBSC 90/518) a una concentración inicial de 0,5 μg/mL . Luego de tres lavados en las mismas condiciones anteriores, se añadieron 100 μL/pozo de un anticuerpo policlonal de carnero anti PT (NIBSC 97/572), a una dilución 1/10 000. Se incubó durante 1 h a 37 °C . Las placas se lavaron nuevamente tres veces con PBS-T y se incubaron 1 h a 37 °C con un conjugado anti-IgG de carnero-peroxidasa (Sigma). Se utilizó una dilución 1 : 10 000 en PBS-T, en un volumen de 100 μL/pozo. Después de los tres lavados con PBS-T se añadió 100 μL de 3'3'5'5' tetrametilbencidina 0,16 mg/mL y H₂O₂ 0,006 % en disolución estabilizadora de sustrato (NaAc 0,11 mol/L, pH 5,5) y se determinó la DO a 450 nm después de añadir 100 μL/pozo de ácido sulfúrico 2,5 mol/L, 20 min luego de iniciada la reacción. Como criterio de positividad se tomaron las DO correspondientes a diluciones del antígeno con valores mayores o iguales al doble de la DO obtenida frente al blanco.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos realizados, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00. En todas las muestras se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett.

Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre los grupos de datos obtenidos en los ensayos de ELISA se utilizó la prueba t de Student empleando la corrección de Welch.

Las diferencias se consideraron significativas cuando P < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción del plasmidio de amplio rango de hospedero pMM-fha-*Optx*-Mut

El plasmidio pMMB67EH es un vector de amplio rango de hospedero derivado del vector RSF1010. Este contiene el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación de amplio rango de hospedero (*oriV*) y el origen de transferencia (*oriT*), los dos últimos provenientes del vector RSF1010. La combinación del *oriV* y el *oriT* le confieren al vector pMMB67EH la capacidad de replicarse en una amplia variedad de hospederos Gram negativos y de transferirse por conjugación bacteriana a hospederos para los cuales no se ha descrito, o resulta complejo realizar un protocolo de transformación.²³ La banda de 3,5 kb obtenida por PCR que contiene al *Optx* salvaje se ligó en el vector pUC19 en los sitios de

restricción *KpnI/HindIII*, con lo que se obtuvo el vector pUC-Optx (Fig. 1A). La obtención del *Optx* mutado se logró al sustituir el fragmento *KpnI/XbaI* del operón salvaje por la banda de 1 kb mutagenizada por PCR, la cual contenía la subunidad S1 con las sustituciones Arg9 por Lys y Glu129 por Gly, en los sitios *KpnI/XbaI* (Fig. 1B). A continuación, se insertó el flanqueante 5' de *fhaB* obtenido por PCR, mediante un ligamiento *KpnI/NdeI* en el vector pUC-Optx-Mut (Fig. 1C). El promotor de *fhaB* se fusionó directamente al codón de inicio de la traducción (ATG) de la subunidad S1 de PT, mediante el ligamiento del flanqueante 5' de *fhaB* en el vector pUC-Optx-Mut en el sitio *NdeI*. Finalmente, se obtuvo el plasmidio de amplio rango de hospedero pMM-fha-Optx-Mut mediante ligamiento de la banda de 3,6 kb obtenida de la digestión *EcoRI/HindIII* del vector pUC-

fha-Optx-Mut en los sitios *EcoRI/HindIII* del vector pMMB67EH (Fig. 1D).

El plasmidio pMM-fha-Optx-Mut obtenido contiene el operón *Optx* mutado bajo el control del promotor temprano *fhaB*. Este se chequeó por restricción con las enzimas *AccI*, *EcoRV* y *ScaI*. La electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de las reacciones mostró las bandas esperadas para cada digestión (Fig. 2).

Obtención de cepas de *B. pertussis* B0085 transformadas con el plasmidio pMM-fha-Optx-Mut

La cepa de *B. pertussis* B0085 es un mutante derivado de *Tohama* incapaz de expresar PT debido a una sustitución en el cromosoma del *Optx* por un gen de resistencia a Kn. Esta cepa fue transformada por conjugación bacteriana con el plasmidio de amplio rango de hospedero

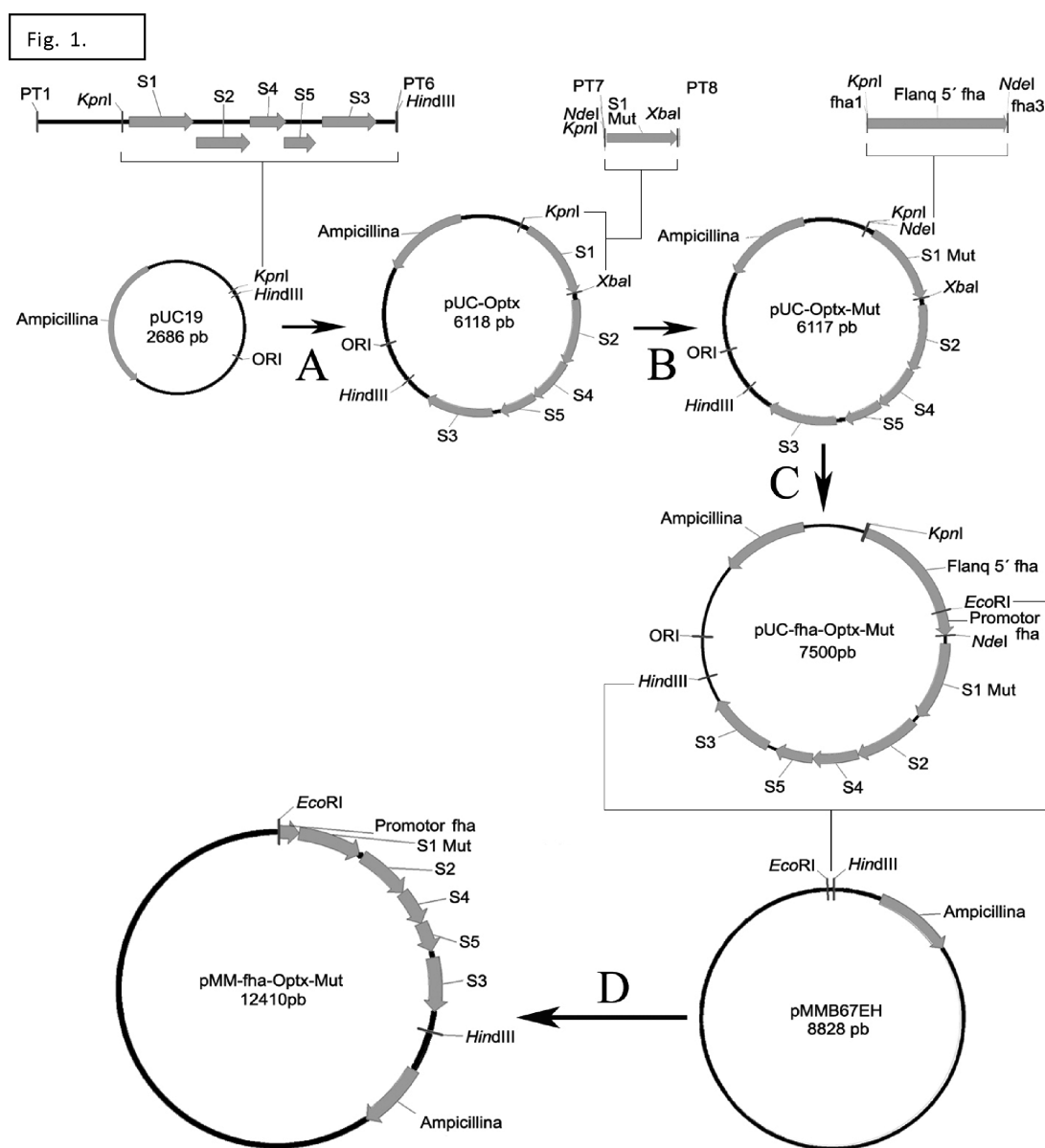


Fig. 1. Construcción del plasmidio de amplio rango de hospedero pMM-fha-Optx-Mut. **A.** Ligamiento *KpnI/HindIII* de la banda *Optx* salvaje en el plasmidio pUC19. **B.** Sustitución de la S1 salvaje por el doble mutante Arg9 por Lys y Glu129 por Gly, mediante el ligamiento *KpnI/XbaI* en el vector pUC-Optx. **C.** Inserción *KpnI/NdeI* de la región flanqueante 5' de *fhaB*, el promotor temprano *fhaB* contenido en el flanqueante se fusionó directamente al codón de inicio de la traducción (ATG) de S1 en el vector pUC-Optx-Mut. **D.** Obtención del plasmidio de amplio rango de hospedero pMM-fha-Optx-Mut mediante ligamiento de la banda de 3,6 kb obtenida de la digestión *EcoRI/HindIII* del vector pUC-fha-Optx-Mut en los sitios *EcoRI/HindIII* del vector pMMB67EH.

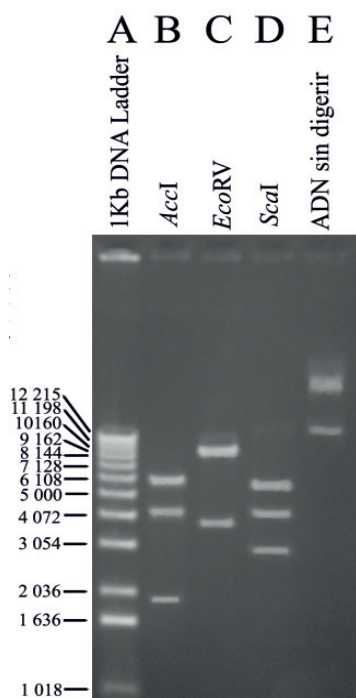


Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % del chequeo por restricción del plasmidio pMM-fha-Optx-Mut. **A.** Patrón de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). **B.** Digestión AccI. Bandas esperadas: 6 000 pb, 4 204 pb, 1 903 pb y 303 pb. **C.** Digestión EcoRV. Bandas esperadas: 8 763 pb y 3 648 pb. **D.** Digestión ScaI. Bandas esperadas: 5 491 pb, 4 061 pb y 2 858 pb. **E.** Plasmidio pMM-fha-Optx-Mut sin digerir.

pMM-fha-Optx-Mut. El análisis por restricción del ADN plasmídico purificado de los clones obtenidos de la conjugación bacteriana con las enzimas AccI, EcoRV y ScaI, mostró nuevamente el patrón de bandas esperado para cada digestión. Estos resultados sugieren que las células fueron transformadas correctamente con el plasmidio pMM-fha-Optx-Mut.

Mediante el alineamiento de las secuencias del plasmidio pMM-fha-Optx-Mut y el *Optx* salvaje de la cepa *Tohama* se comprobaron las sustituciones de bases realizadas durante la mutagénesis de la subunidad S1 de PT (Fig. 3). Para introducir el primer cambio aminoacídico se

sustituyó el codón CGC por AAG, generando el cambio de la Arg9 por Lys. La sustitución de Glu129 por Gly se realizó cambiando las bases AA por GG de los codones GAA y GGG respectivamente (Fig. 3).

Nencioni y cols.¹⁸ demostraron que estos cambios aminoacídicos eliminan las reacciones adversas típicas de PT como inducción de leucocitosis, potenciación de anafilaxis, estimulación de secreción de insulina y sensibilidad a histamina. Sin embargo, la PT mutante mantiene todas las propiedades físicas y químicas de la PT salvaje, incluyendo la afinidad por anticuerpos neutralizantes. Además, es capaz de inducir elevadas cantidades de anticuerpos neutralizantes y proteger ratones contra el reto intracraneal con *B. pertussis* virulenta.

Expresión y cuantificación de PT

El ensayo de ELISA realizado a las suspensiones celulares de cuatro clones transformantes demostró que estas células recuperaron la capacidad de expresar PT a partir del plasmidio pMM-fha-Optx-Mut. Los niveles de expresión de PT de los clones fueron de 3 a 14 veces superiores a los de la cepa *Tohama* (Fig. 4), de la cual se derivó el mutante B0085. Por otra parte, no se detectó expresión de PT en la cepa B0085, empleada como control negativo.

El clon 3 mostró los mayores niveles de expresión con 16,2 µg/mL, aunque no se observaron diferencias significativas con el clon 2, que expresó 12,7 µg/mL. El clon 1, por otra parte, expresó 10,4 µg/mL, no mostró diferencias significativas con el 2, pero sí con el 3. El clon 4 expresó las cantidades más bajas de PT, con 2,9 µg/mL, y se observaron diferencias significativas con los tres clones restantes. Los niveles de expresión de los cuatro clones fueron significativamente superiores (P < 0,05) a los de la cepa *Tohama*, la cual expresó 1,2 µg/mL.

Los niveles de expresión de los clones, significativamente superiores a los de *Tohama*, pueden deberse a dos causas fundamentales. La primera, es que la expresión de PT de estos se encuentra regulada por el promotor temprano de *fhaB*, y por otro lado, el *Optx* se encuentra de forma episomal, por lo que existe un mayor número de copias con respecto a la cepa salvaje.

Los clones 1, 2 y 3 expresaron niveles considerablemente elevados de PT inactivada con respecto a la cepa salvaje, por lo que el empleo de cualquiera de estos resulta una alternativa más económica para producir PT con fines vacunales. Además, la atenuación genética de PT presenta mayores ventajas económicas y de seguridad que la inactivación química, debido a que esta última

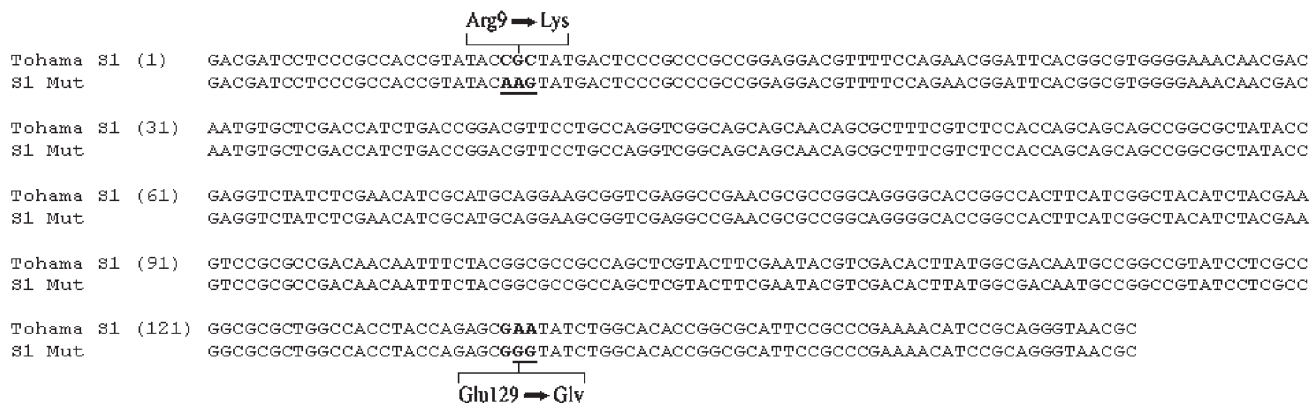


Fig. 3. Alineamiento de las secuencias de la subunidad S1 de PT salvaje de la cepa *Tohama* y el mutante de S1 generado por PCR. Los codones mutados se muestran en negritas y las bases sustituidas se encuentran subrayadas.

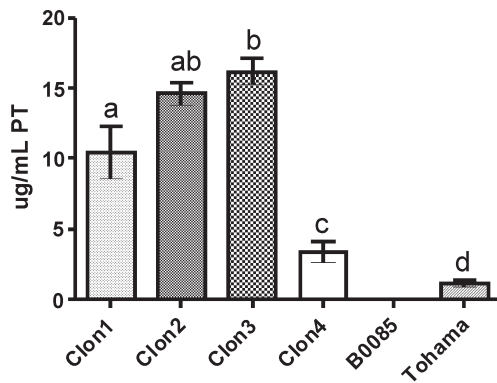


Fig. 4. Cuantificación de PT mediante ELISA de captura. Las barras corresponden al promedio de tres experimentos realizados independientemente. Niveles de expresión: clon 1, 10,4 $\mu\text{g/mL}$; clon 2, 14,6 $\mu\text{g/mL}$; clon 3, 16,2 $\mu\text{g/mL}$; clon 4, 2,9 $\mu\text{g/mL}$. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según la prueba t de Student empleando la corrección de Welch.

puede rendir un producto con reducida inmunogenicidad o con actividad tóxica residual, o ambas.²⁴ Esta característica pudiera ser responsable de los severos efectos adversos atribuidos a las vacunas de células completas contra la tos ferina.¹⁶

CONCLUSIONES

La combinación del uso del promotor temprano de *fhaB* y el aumento de copias del operón *Optx*, al emplear el plasmidio de amplio rango de hospedero pMMB67EH como vector de expresión, incrementó de 3 a 14 veces los niveles de PT en los cuatro clones evaluados.

Teniendo en cuenta los elevados niveles de expresión de PT genéticamente inactivada de los clones B0085PT con respecto a los de la cepa salvaje parental, pudieran ser empleados estos clones como sistemas de expresión para el desarrollo de vacunas acelulares más seguras y económicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Steinhoff MC, Reed GF, Decker MD, Edwards KM, Englund JA, Pichichero ME *et al.* A randomized comparison of reactogenicity and immunogenicity of two whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics*. 1995;96:567-570.
- Decker MD, Edwards KM, Steinhoff MC, Rennels MB, Pichichero ME, Englund JA *et al.* Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics*. 1995;96:557-566.
- Edwards KM, Meade BD, Decker MD, Reed GF, Rennels MB, Steinhoff MC *et al.* Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics* 1995; 96:548-557.
- Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi A, Anemona A *et al.* A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. *N Engl J Med*. 1996;334:341-348.
- Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, and Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med*. 1996;334:349-355.

- Locht C, and Keith JM. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science*. 1986;232:1258-1264.
- Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Casagli MC, Borri M, Antoni G *et al.* Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4631-4635.
- Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K and Ui M. A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem*. 1983;258:6756-6761.
- Mattoo S and Cherry JD. Molecular pathogenesis, Epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18:326-382.
- Burns VC, Fiddner S, Cheung AM and Verma A. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits *in vivo* and their interaction with the *ptl* transport apparatus. *Infect Immun*. 2004;72:5365-5372.
- Kaslow HR, and Burns DL. Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J*. 1992;6:2684-2690.
- Munoz JJ. Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system in pathogenesis and immunity in pertussis. *In A. C. Wardlaw and R. Parton (ed.), Pathogenesis and immunity in pertussis*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Ltd.: 1988:173-192.
- Irie Y, Mattoo S and Yuk MH. The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 2004;186:5692-5698.
- Veal-Carr WL and Stibitz S. Demonstration of differential virulence gene promoter activation *in vivo* in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Molecular Microbiology*. 2005;55:788-798.
- Cotter PA and Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol*. 2003;11:367-373.
- Edwards KM and Decker MD. Pertussis Vaccine. *In Plotkin S and Orenstein WA (ed.), Vaccines 4th ed.* Philadelphia, Pa.: Elsevier: 2004:310-314
- Purdy KW, Hay JW, Botteman MF and Ward JI. Evaluation of strategies for use of acellular pertussis vaccine in adolescents and adults: a cost-benefit analysis. *Clin Infect Dis*. 2004;39:20-28.
- Nencioni L, Pizza M, Bugnoli M, De Magistris T, Di Tommaso A, Giovannoni F *et al.* Characterization of Genetically Inactivated Pertussis Toxin Mutants: Candidates for a New Vaccine against Whooping Cough. *Infection and Immunity*. 1990;58:1308-1315.
- Black SB, Shinefield HR, Bergen R, Hart C, Kremers R, Lavetter A *et al.* Safety and immunogenicity of Chiron Biocine recombinant acellular pertussis-diphtheria-tetanus vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:53-18.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA *et al.* Short protocols in molecular biology; New York, USA: John Wiley & Sons Inc.: 1995.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
- Dower WJ, Miller JF and Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:6127.
- Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M *et al.* Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*. 1986;48:119-131.
- Steinman L, Weiss A, Adelman N, Lim M, Zuniga R, Ochlerlert J *et al.* Pertussis toxin is required for pertussis vaccine encephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:8733-8736.