

Expresión extracromosomal del antígeno pertactina en *Escherichia coli* y *Bordetella pertussis*

Beatriz Ferrán, Lourdes Proenza, Ernesto Marcos, Celso Pérez y Javier Campos.

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de junio de 2009.

Aceptado: 19 de agosto de 2009.

Palabras clave: pertactina, expresión extracromosomal, promotor de *fhaB*, vector de amplio rango de hospederos.
Key words: pertactin, extrachromosomal expression, *fhaB* promoter, broad-host-range plasmid.

RESUMEN. *Bordetella pertussis* es el agente causal de la tos ferina o pertussis, una enfermedad respiratoria altamente contagiosa. Aunque las primeras vacunas contra esta enfermedad eran de células muertas, muchos países actualmente emplean variantes acelulares menos reactogénicas y más eficaces. La pertactina (Prn) es uno de los antígenos de *B. pertussis* implicados en la inmunidad protectora de la mayoría de estas vacunas acelulares. Prn es una proteína autotransportadora y polimórfica de aproximadamente 60 kDa. Han sido descritas 13 variantes diferentes, de las cuales Prn1 y Prn2 son dos de las más estudiadas. Para la obtención de los componentes de estas vacunas es necesario desarrollar sistemas de elevados niveles de expresión de los antígenos. Una de las estrategias seguidas con este fin es aumentar los niveles de transcripción de los genes que codifican para estas proteínas y su número de copias en la célula. En este trabajo fueron insertados los genes *prn1* y *prn2* en el vector de amplio rango de hospederos pMMB67EH bajo la regulación de los promotores de *fhaB* y *tac*. Como resultado fueron obtenidas cepas de *B. pertussis* capaces de expresar entre 11 y 23 veces más Prn que cepas salvajes analizadas, además de cepas de *Escherichia coli* en las que esta proteína está asociada a la superficie celular. La detección y cuantificación de Prn fueron realizadas mediante ELISA.

ABSTRACT. *Bordetella pertussis* is the causal agent of whooping cough (pertussis), a highly contagious respiratory illness. Although the initial vaccines against the disease consisted of killed cells, nowadays many countries use acellular variants less reactogenic and more efficacious. Pertactin (Prn) is one of the *B. pertussis*'s antigens implicated in protective immunity of most of these acellular vaccines. Prn is a polymorphic autotransporter protein of around 60 kD and 13 different variants have been described so far; Prn1 and Prn2 are two of the most studied variants. For obtaining acellular vaccine components it is necessary to develop high-levels antigen expression systems. With this purpose, one of the strategies followed is increasing the rate of transcription for these protein's genes and their number of copies in the cell. In this work *prn1* and *prn2* genes were inserted into the broad-host-range plasmid pMMB67EH under the regulation of *fhaB* and *tac* promoters. As a result it was obtained *B. pertussis* strains capable of expressing between 11 and 23 times more Prn than analyzed wild ones. It was also obtained *E. coli* strains in which Prn was detected in association with the cellular surface. The detection and quantification of pertactin antigen was performed by ELISA.

INTRODUCCIÓN

La tos ferina o pertussis es una enfermedad respiratoria aguda y altamente contagiosa, causada por la bacteria Gram negativa *Bordetella pertussis*.¹ Las primeras vacunas contra esta enfermedad fueron introducidas en la década de 1940 y consistían en células completas muertas de *B. pertussis*, pero en muchos países han sido desplazadas por variantes acelulares menos reactogénicas y más eficaces, compuestas solo por algunas proteínas bacterianas.² La pertactina (Prn) es uno de los antígenos de *B. pertussis* implicados en la inmunidad protectora de la mayoría de estas vacunas acelulares.²⁻⁷

Prn es una proteína autotransportadora que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (motivo RGD), involucrada en la adherencia del microorganismo a la célula eucariota.⁸ Este autotransportador es procesado a partir de un precursor de 93 kDa que da lugar a una proteína de 22 kDa y a otra de 69 kDa, empleada en las vacunas acelulares.⁹ Esta proteína madura se secreta al exterior celular, una parte permanece unida no covalentemente a la superficie de la bacteria y el resto se libera al medio extracelular.¹⁰ Prn es una proteína polimórfica y las variantes Prn1 y Prn2 son dos de las más estudiadas de los 13 tipos diferentes descritos. Las diferencias aminoácidas,

Correspondencia:

Lic. Beatriz Ferrán Pérez

Dpto. de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: beatriz.ferran@cnic.edu.cu.

localizadas en la región 1 de la proteína, consisten en: el cambio de dos aminoácidos consecutivos (Arg-Val, en Prn1, por Phe-Gly, en Prn2) y la adición del pentapéptido Gly-Phe-Gly-Pro-Gly, en Prn2.¹¹

En la producción de las vacunas acelulares contra *B. pertussis* es necesario disponer de sistemas de elevado nivel de expresión que hagan que el proceso de obtención de sus componentes sea más eficiente y económico. Una de las estrategias seguidas para alcanzar este propósito es el empleo de vectores que permitan el incremento de la transcripción de moléculas específicas de ARN, controlado por promotores fuertes.¹² Dos promotores que cumplen con esta característica son el *tac*, inducible por IPTG en diferentes hospederos Gram negativos como *Escherichia. coli*, y el promotor de *fhaB*, (*pfhaB*) de *B. pertussis*. El gen *fhaB* codifica para otro de los determinantes de virulencia de este microorganismo: la hemaglutinina filamentosa (FHA), que constituye el factor principal de adherencia del microorganismo a las células animales y es una de las proteínas mayormente expresadas.^{10,13} El promotor de *fhaB* contiene un sitio de unión de gran afinidad al factor de transcripción BvgA, ubicado cerca de 88 pb antes del origen de transcripción del gen.¹⁴ La unión cooperativa de tres dímeros de BvgA fosforilada a este sitio provoca la activación de la transcripción del promotor en diferentes estados del ciclo de vida del microorganismo.^{15,16}

Por otra parte, el aumento de la cantidad de copias del gen a expresar es limitado cuando este incremento se hace a partir del cromosoma bacteriano, sin embargo, se logra si se introduce el gen dentro de un vector de expresión replicativo. Un ejemplo de este tipo de vector de expresión es el plasmidio de amplio rango de hospederos pMMB67EH, que permite la expresión de sus genes en gran variedad de bacterias Gram negativas, donde puede ser introducido por conjugación, especialmente en aquellas para las que no se conoce ningún protocolo de transformación.¹²

Este trabajo tuvo como objetivo expresar de manera extracromosomal las proteínas Prn1 y Prn2 en cepas de *B. pertussis* y *E. coli*. Para ello fueron insertados los genes *prn1* y *prn2* bajo la regulación de los promotores *pfhaB* y *tac* en el vector de amplio rango de hospederos pMMB67EH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmidios y medios de cultivo

En este estudio fueron utilizados diversas cepas bacterianas y plasmidios (Tabla 1), además de los medios de cultivo siguientes: para *E. coli*, Luria-Bertani (LB) (triptona, 10 g/L; extracto de levadura, 5 g/L; cloruro de sodio, 10 g/L; agar 1,5 g/L para medio sólido) ajustado a pH 7; para *B. pertussis*, agar Bordet-Gengou (BG) suplementado con sangre de carnero al 15 %. Según el requerimiento, los medios fueron suplementados con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0,1 mmol/L, Xgal a 50 μg/mL y ampicillina (Amp) a 100 μg/mL. Los componentes de estos medios y el resto de los reactivos fueron adquiridos (BioCen, Cuba; Oxoid, R.U.; Merck Alemania; Sigma y Promega, EE. UU.). Las placas de *E. coli* fueron incubadas a 37 °C y los cultivos líquidos, a la misma temperatura y 240 r/min de agitación. Por su parte, las placas de *B. pertussis* fueron crecidas a 35 °C en ambiente de humedad relativa superior al 80 %.

Técnicas usadas en el trabajo con ADN

Para el aislamiento y la purificación de ADN plasmídico, así como de bandas de ADN a partir de geles de agarosa, fueron utilizados los sistemas *Wizard Plus SV*

Minipreps DNA Purification System y *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, respectivamente (Promega, EE. UU.). Las reacciones enzimáticas de modificación/restricción de ADN fueron realizadas teniendo en cuenta las recomendaciones de los proveedores (Promega, EE.UU.) Para ligar fragmentos digeridos de ADN en todas las construcciones genéticas, fue utilizada la enzima ligasa de ADN T4 en un volumen final de 20 μL. Para la secuenciación de ADN fueron contratados los servicios de la compañía Macrogen (Korea del Sur).

La separación de bandas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (m/v), en disolución reguladora TAE (Tris-acetato a 40 mmol/L, EDTA a 20 mmol/L) y a voltaje constante (4 V/cm). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fueron realizadas en un termociclador Eppendorf AG 22331 (Hamburg, Alemania), en un volumen final de 50 μL, a partir de 200 ng de ADN molde, con 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,6 mmol/L de cada oligonucleótido (Tabla 1), 200 μmol/L de cada nucleótido y empleando la polimerasa *Expand long* (Roche). La amplificación de los fragmentos se realizó en 30 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 1 min, 30 s de hibridación a 60 °C y 1,5 min de extensión a 72 °C; al final, se hizo un paso adicional de extensión a 72 °C durante 5 min.

Construcciones genéticas

Construcción del plasmidio pUC19-Prn1

La clonación del gen *prn1* fue realizada mediante la amplificación y ensamblaje de dos fragmentos de ADN a través de síntesis por PCR, empleando como molde ADN genómico de la cepa de *B. pertussis* Bp8132 (Tohama) (Fig. 1). Para la amplificación de las regiones 5' y 3' del gen fueron empleados los pares de oligonucleótidos CNC 08-196/197 y CNC 08-198/199, respectivamente (Tabla 1).

El fragmento 5' obtenido por PCR (1,65 kb) fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *KpnI* e insertado en el plasmidio pUC19 digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plasmidio pUC19-5'prn1. La otra mitad del gen (1,2 kb) fue digerida con las enzimas *NdeI* y *HindIII* e insertada en el plasmidio pUC19-5'prn1, con lo cual quedó conformado finalmente el gen *prn1* en el nuevo plasmidio denominado pUC19-prn1 (Fig. 2). La estructura genética de los vectores pUC19-5'prn1 y pUC19-prn1 fue verificada por restricción con las enzimas *KpnI*, *HindIII* y *XhoI*.

Construcción del plasmidio replicativo pMMB-pfhaB-prn1

Para clonar el gen *prn1* bajo el promotor del gen *fhaB*, los plasmidios pUC19-prn1 y pGEM-T-fha4-5-fha1-3-Optx (Tabla 1) fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. De estas reacciones fueron obtenidos un fragmento de 2,85 kb, correspondiente al gen *prn1*, y otro de 5,79 kb que provino del plasmidio pGEM-T-fha4-5-fha1-3-Optx. Estos fragmentos fueron ensamblados y dieron origen al plasmidio pGEM-T-fha4-5-fha1-3-prn1 (Fig. 2).

De este nuevo plasmidio fue extraído un fragmento que contenía el gen *prn1* bajo el promotor de *pfhaB*, mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Este fragmento de 3,1 kb fue insertado en el plasmidio pMMB67EH, previamente digerido con las mismas enzimas. Como resultado de este ligamiento fue obtenido el nuevo plasmidio replicativo pMMB-pfhaB-prn1 (Fig. 2).

Transformación de *prn1* en *prn2*

Para transformar *prn1* en *prn2* fue sustituido un fragmento de aproximadamente 760 pb del gen *prn1* del plasmidio pUC19-prn1, digerido con las enzimas *SacI* y

Tabla 1. Relación de cepas, plasmidios y oligonucleótidos utilizados.

Cepas/plasmidios/oligonucleótidos	Características o secuencia
<i>E. coli.</i>	
JM109.	[<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$].
JM109/pMMB-pfhaB-prn1.	Cepa JM109 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn1.
Mach1.	F- $\phi 80(lacZ)\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(r_{\kappa} m_{\kappa}^{+}) \Delta recA1398 endA1 tonA$.
Mach1/pMMB-pfhaB-prn2.	Cepa Mach1 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn2.
SM10 λ pir.	[<i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu (λpirR6K), Kn^r</i>].
SM10 λ pir/pMMB-pfhaB-prn1.	Cepa SM10 λ pir portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn1.
SM10 λ pir/pMMB-pfhaB-prn2.	Cepa SM10 λ pir portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn2.
<i>B. pertussis.</i>	
Bp165.	Tipo salvaje.
Bp8132 (Tohama).	Tipo salvaje.
B1686.	Derivada de la cepa tipo salvaje B213, <i>prn::Kn</i> .
B1686/pMMB-pfhaB-prn1(1).	Clon 1 de la cepa B1686 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn1.
B1686/pMMB-pfhaB-prn1(2).	Clon 2 de la cepa B1686 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn1.
B1686/pMMB-pfhaB-prn2(1).	Clon 1 de la cepa B1686 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn2.
B1686/pMMB-pfhaB-prn2(2).	Clon 2 de la cepa B1686 portadora del plasmidio pMMB-pfhaB-prn2.
Plasmidios.	
pUC19.	Vector general de clonaje.
pPRN2.	Vector de expresión pTE9b con en gen <i>prn2</i> insertado entre los sitios <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> .
pUC19-prn1.	Plasmidio pUC19 con el gen <i>prn1</i> insertado entre los sitios <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i> .
pUC19-prn2.	Plasmidio pUC19-prn1 con el fragmento <i>SmaI/SacI</i> (747 pb) del gen <i>prn2</i> del plasmidio pPRN2 .
pGEM-T-fha4-5-fha1-3-Optx.	Operón completo de PT entre los flanqueantes <i>fha 4-5</i> y <i>fha1-3</i> , clonados en el plasmidio pGEM-T.
pGEM-T-fha4-5-fha1-3-prn1.	Derivado del pGEM-T-fha4-5-fha1-3-Optx pero con el gen <i>prn1</i> en el lugar del operón de PT.
pMMB67EH.	IncQ Sm ^R , Su ^R $\Delta[PstI-PvuII, 2,87 kb]$, $\Omega[lacI^{\Omega}, tacP, rrnB, bla, NruI-AhaIII, 3,0 kb]$, $\Delta[polylinker M13mp8]$, $\Omega[polylinker M13mp18]$, Amp ^R .
pMMB-pfhaB-prn1.	Plasmidio pMMB67EH con el gen <i>prn1</i> insertado entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> y regulado por los promotores <i>pfhaB</i> y <i>tac</i> .
pMMB-pfhaB-prn2.	Plasmidio pMMB67EH con el gen <i>prn2</i> proveniente del plasmidio pUC19-prn2 insertado entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> y regulado por los promotores <i>pfhaB</i> y <i>tac</i> .
Oligonucleótidos.	
CNC 08-196.	CTGGCATCATATGAACATGTCTCTGT.
CNC 08-197.	GATAGGTACCGATATCGACC.
CNC 08-198.	TGCTGGTGCAGACGCCACTA.
CNC 08-199.	CTGCAAGCTTCGGCCAGCACCAGC.

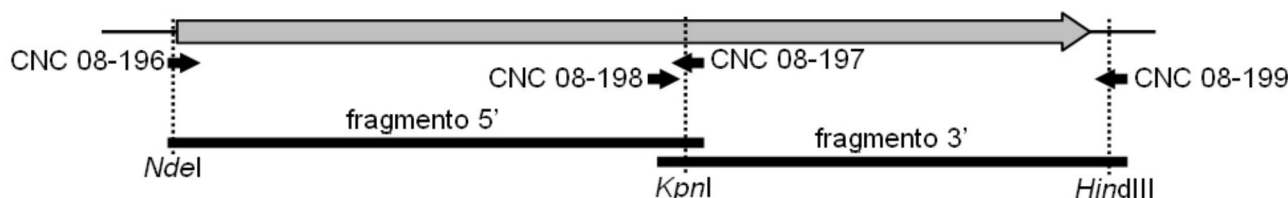


Fig. 1. Estrategia seguida para la síntesis por PCR del gen *prn1* (en gris). Las líneas continuas gruesas se corresponden con los fragmentos 5' y 3' obtenidos en las reacciones de amplificación. Las flechas negras representan los oligonucleótidos empleados e indican el sentido en el cual fue amplificado el ADN. Las líneas discontinuas señalan los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI*, *KpnI* y *HindIII* utilizadas en el ensamblaje del gen.

SmaI, por otro fragmento similar, obtenido al digerir el plasmidio pPRN2 con las mismas enzimas. De esta manera quedó conformado el plasmidio pUC19-*prn2* (Fig. 2). De este nuevo plasmidio fue extraído el gen *prn2* que sustituyó a *prn1* (2,8 kb) en el plasmidio pMMB-pfhaB-*prn1*, digiriendo en ambos casos con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. De esta forma quedó construido el plasmidio pMMB-pfhaB-*prn2* (Fig. 2).

Transformaciones bacterianas

Las transformaciones de las cepas de *E. coli* JM109 y Mach1 con las reacciones de ligamiento, así como las de SM10λpir con ADN plasmídico, fueron realizadas mediante electroporación según Dower y cols.,¹⁷ a 2,5 kV y en cubetas de 1 mm de separación entre los electrodos.

Por otra parte, la cepa de *B. pertussis* B1686 fue transformada por conjugación con la cepa SM10λpir, portadora del plasmidio a transferir. Para ello fueron mezcladas biomasa fresca de ambas cepas, provenientes de placas de BG y LB. La mezcla obtenida fue extendida en BG suplementado con MgSO₄ 20 mmol/L y MgCl₂ 10 mmol/L, e incubada a 35 °C y humedad durante 6 h. Al cabo de ese tiempo fue recogida la masa celular y sembrada en placas de BG suplementadas con Amp y MgSO₄ 20 mmol/L, las que fueron posteriormente incubadas en las condiciones anteriores durante 48 h. De esta manera quedaron construidas las cepas exconjugantes de *B. pertussis* B1686/pMMB-pfhaB-*prn1* y B1686/pMMB-pfhaB-*prn2*.

Expresión de Prn1 y Prn2 en *E. coli* y *B. pertussis*

Para la expresión extracromosomal de las proteínas Prn1 y Prn2 en *E. coli*, fue utilizada la cepa SM10λpir transformada con los plasmidios pMMB-pfhaB-*prn1* y pMMB-pfhaB-*prn2*, respectivamente. El microorganismo fue cultivado en medio LB líquido a 37 °C y a 240 r/min hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) cercana a 0,5, momento en el cual fue añadido el IPTG para activar el promotor *tac* e inducir la expresión. El cultivo inducido fue incubado bajo las mismas condiciones iniciales durante 4 h. Como control negativo de la expresión fue tomado otro cultivo de la cepa SM10λpir transformada, crecido en las mismas condiciones de forma paralela a los demás, pero sin inducir con IPTG. En todos los casos fueron tomadas muestras de los cultivos antes y después de inducir.

Las proteínas Prn1 y Prn2 en *B. pertussis* fueron expresadas a partir del cultivo de los exconjugantes B1686/pMMB-pfhaB-*prn1* y B1686/pMMB-pfhaB-*prn2*, respectivamente. Estas cepas fueron sembradas en placas de BG suplementadas con Amp e incubadas a 35 °C en condiciones de humedad durante 48 h. La cepa parental B1686 (*prn*⁻) fue usada como control negativo de la expresión. Transcurrido el tiempo de crecimiento, fue

recogida la biomasa celular de cada cepa. Estos estudios de expresión, tanto en *E. coli* como en *B. pertussis*, fueron realizados en tres ensayos independientes (n = 3).

Detección y cuantificación de Prn1 y Prn2 mediante ELISA

La detección y cuantificación de Prn1 y Prn2 fueron efectuadas mediante ELISA (del inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*). Previamente, los antígenos a evaluar fueron preparados a partir de las muestras de células de *E. coli* y *B. pertussis* recogidas en los ensayos de expresión de Prn ya descritos. En el caso de *E. coli*, fueron analizados: las suspensiones celulares del cultivo control y de la muestra tomada sin inducir, el precipitado celular del cultivo inducido y su sobrenadante. Por su parte, las suspensiones de células de *B. pertussis*, obtenidas de las placas de BG, fueron ajustadas a una DO = 5. Todas las muestras fueron inactivadas por calor a 56 °C durante 30 min, tratamiento que no afecta la integridad celular.

Esta técnica de ELISA de células fue estandarizada en el instituto de investigación holandés RIVM y es el ensayo de rutina para el análisis de aislados clínicos. El protocolo seguido en este trabajo está descrito a continuación. Fueron usadas placas Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp™, recubiertas con el anticuerpo policlonal anti-Prn Pab 164, a una dilución 1 : 2 000 en disolución de Na₂CO₃ 0,04 mol/L y pH 9,6, durante 2 h a 35 °C y ambiente húmedo. La incubación de las placas en cada uno de los pasos posteriores del ensayo fue realizada bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, pero durante 1 h. El bloqueo fue realizado con leche descremada al 2% y el lavado de las placas, con tween 20 al 0,1% en PBS (PBST), al igual que los demás lavados luego de cada paso de incubación. Una vez aplicados los antígenos en los pocillos correspondientes, fueron realizadas diluciones seriadas 1 : 2 y 1 : 3 en PBST, para las muestras de *E. coli* y *B. pertussis*, respectivamente. El antígeno Prn del NIBSC (del inglés, *National Institute for Biological Standards and Control*, R.U.) *Bordetella pertussis*, 69 kD (90/654) fue usado en la construcción de la curva patrón, a una concentración inicial de 1,5 µg/mL. Para la detección fueron utilizados el anticuerpo policlonal del NIBSC *Bordetella pertussis* anti 69 kD serum (sheep) (97/558) y el conjugado IgG peroxidasa monoclonal anti-carnero (Sigma A-9452), ambos a una dilución 1 : 10 000 en PBST. El revelado de la reacción fue realizado con 3'3'5'5' tetrametilbencidina 0,16 mg/mL y H₂O₂ 0,006%, en disolución de NaAc 0,11 mol/L a pH 5,5. Aproximadamente 15 min después, la reacción fue detenida con H₂SO₄ 2,5 mol/L y la DO fue medida a 450 nm en un espectrofotómetro DIAREADER UV ELx800 (Dialab GMBH, Austria). El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante la corrección de Welch de la prueba *t* de Student, para un valor de P < 0,05.

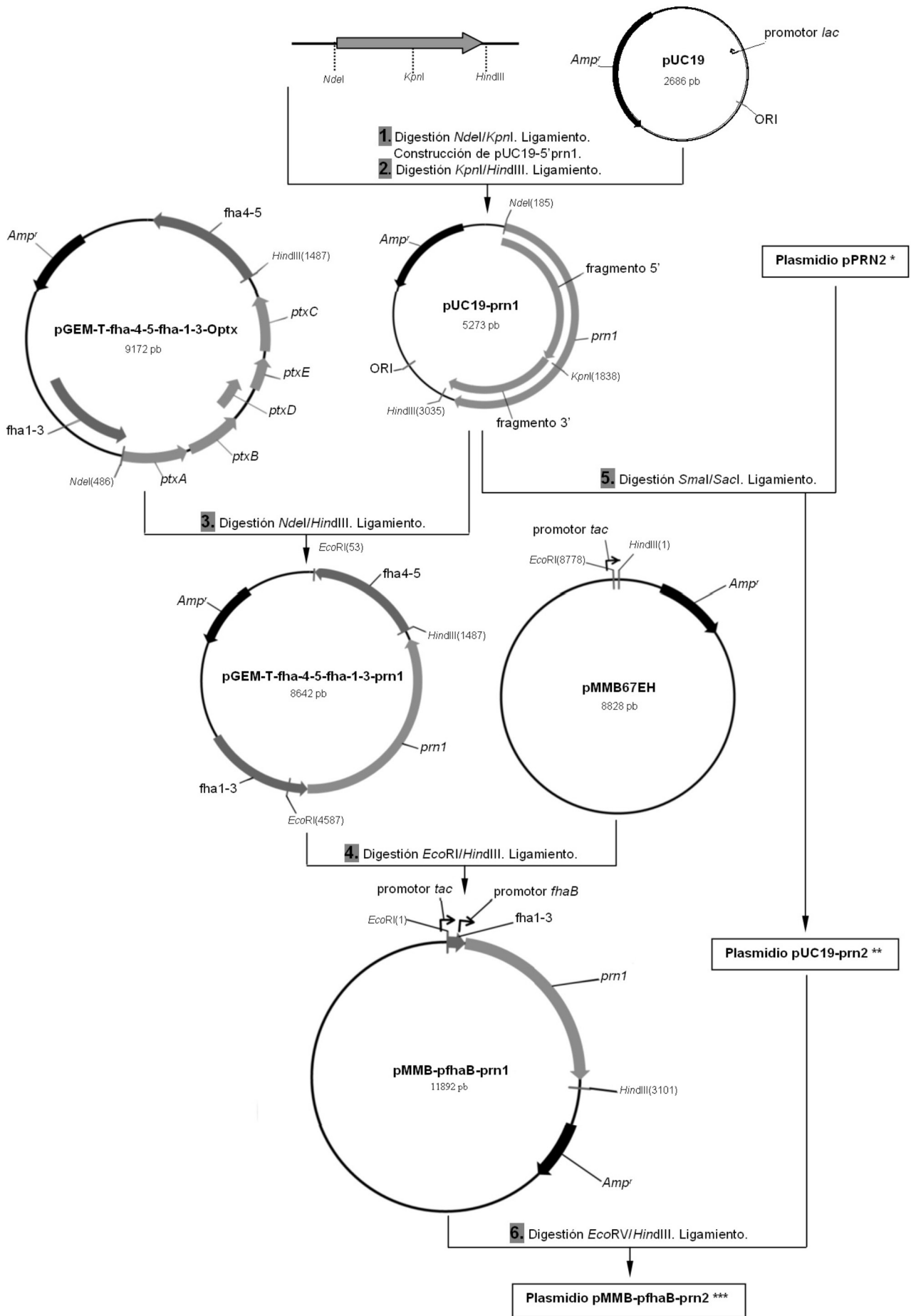


Fig. 2. Estrategia seguida en la construcción de los plasmidios de amplio rango de hospederos pMMB-pfhaB-prn1 y pMMB-pfhaB-prn2. De los plasmidios encerrados en los recuadros: * No se dispone del mapa de restricción. ** Mapa genético similar al del plasmidio pUC19-prn1. *** Mapa genético similar al del plasmidio pMMB-pfhaB-prn1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación del gen *prn1* y construcción del plasmidio pUC19-Prn1

Prn1 es una de las variantes de Prn más estudiadas y es la que expresa la cepa de *B. pertussis* Bp8132(Tohama), cuyo ADN fue usado como molde en este trabajo para la síntesis del gen *prn1* por PCR. Debido al tamaño de *prn1* (2,85 kb) fue seguida una estrategia de amplificación del gen en dos fragmentos (Fig. 1) que posteriormente fueron ensamblados en el plasmidio pUC19. Este plasmidio es de elevado número de copias, tiene el gen de resistencia a Amp y permite la selección entre colonias blancas y azules cuando se replica en la cepa JM109, de modo que facilitó el pesquizado de colonias. Luego de la transformación de esta cepa de *E. coli* con la construcción genética, fueron seleccionadas varias de las colonias blancas obtenidas, cuyo ADN plasmídico fue analizado y escogido un clon que mostró el patrón de restricción esperado. Este nuevo plasmidio fue denominado pUC19-Prn1 y la identidad del gen *prn1* fue confirmada por secuenciación.

El gen *prn1* bajo el promotor de *fhaB* en el plasmidio de amplio rango de hospederos pMMB-pfhaB-prn1

Para lograr una elevada expresión de Prn se decidió clonar el gen *prn1* bajo un promotor fuerte e insertar esta construcción en un plasmidio de amplio rango de hospederos. El gen *fhaB* codifica para la hemaglutinina filamentosa (FHA), una de las proteínas mayoritarias de *B. pertussis*, y es uno de los genes mayormente expresados. El promotor de *fhaB* contiene un sitio de unión de gran afinidad al factor de transcripción BvgA que consiste en dos repeticiones invertidas del heptanucleótido TTTC(C/G)TA, ubicadas cerca de 88 pb antes del origen de transcripción del gen.¹⁴ La unión cooperativa de tres dímeros de BvgA fosforilada a este sitio provoca la activación de la transcripción de *fhaB*, tanto en la fase de colonización del tracto respiratorio por el microorganismo, como en la fase de transmisión.^{15,16} Teniendo esto en cuenta, pudiera decirse que la activación del promotor de este gen es prácticamente constitutiva por cuanto la inserción del gen *prn1* bajo su regulación lograría mayores niveles de expresión de este antígeno.

El plasmidio pGEM-T-fha4-5-fha1-3-Optx es una construcción ya existente, realizada en el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, que contiene el operón de la toxina de *B. pertussis* (PT) entre las regiones flanqueantes del gen *fhaB*, donde se incluye su promotor. La estrategia seguida fue remplazar el operón de PT de este plasmidio por el gen *prn1*, presente en el pUC19-Prn1, como fue descrito en Materiales y Métodos. La reacción final de ligamiento fue introducida en la cepa JM109 y de varias de las colonias transformadas obtenidas fue aislado el ADN plasmídico y escogido uno cuyo patrón de restricción coincidió con el de la construcción genética esperada. Este nuevo plasmidio fue denomina-

do pGEM-T-fha4-5-fha1-3-prn1 y por secuenciación fue comprobada su estructura genética.

Otro de los aspectos tenidos en cuenta para aumentar los niveles de expresión de Prn fue insertar el gen *prn1* en un plasmidio y, de esta manera, aumentar el número de copias del gen a transcribir. Con este fin fue insertado el fragmento que contenía a *prn1* bajo el promotor de *pfhaB* en el plasmidio replicativo pMMB67EH (Tabla1). Este plasmidio es de amplio rango de hospederos y permite la expresión de sus genes en gran variedad de bacterias Gram negativas, donde puede ser introducido por conjugación.¹² Cuenta además con el gen de resistencia a Amp, y los genes heterólogos insertados en su sitio múltiple de clonaje quedan regulados por el promotor *tac*, inducible con IPTG.¹²

La banda de 3,1 kb que contenía el gen *prn1* bajo el promotor de *pfhaB* fue extraída del plasmidio pGEM-T-fha4-5-fha1-3-prn1 e introducida en el pMMB67EH. De las colonias obtenidas, luego de transformar la cepa JM109 con esta reacción de ligamiento, fueron seleccionadas varias y analizado su ADN plasmídico. Finalmente fue escogido un plasmidio denominado pMMB-pfhaB-prn1 (Fig. 2) y su mapa genético coincidió con el patrón de restricción esperado. De esta forma, el gen *prn1* quedó clonado bajo el control de los promotores de *pfhaB* y *tac*. El nuevo plasmidio obtenido fue secuenciado y resultó correcto su mapa genético.

Obtención del plasmidio replicativo pMMB-pfhaB-prn2

Prn es una proteína polimórfica, de la cual han sido identificadas 13 variantes diferentes. Las variaciones de las cadenas peptídicas están limitadas principalmente a las regiones 1 y 2, que contienen los fragmentos repetitivos Gly-Gly-X-X-Pro y Pro-Gln-Pro, respectivamente.¹⁸ Prn1 y Prn2 son dos de las variantes de Prn más estudiadas y las diferencias entre ellas, localizadas en la región 1 de la proteína, consisten en el cambio de dos aminoácidos consecutivos (Arg-Val, en Prn1, por Phe-Gly, en Prn2) y la adición del pentapéptido Gly-Phe-Gly-Pro-Gly, en Prn2,¹¹ (Fig. 3).

Para expresar Prn2 fue construido el plasmidio pMMB-pfhaB-prn2 a partir del ya existente pMMB-pfhaB-prn1, según fue descrito en Materiales y Métodos. La reacción final de ligamiento fue transformada en la cepa de *E. coli* Mach1 y de las colonias obtenidas fue seleccionada una cuyo patrón de restricción de su ADN plasmídico coincidió con el esperado. El nuevo plasmidio pMMB-pfhaB-prn2 fue secuenciado y comprobada la identidad del gen *prn2*.

Obtención de las cepas de *B. pertussis* transformadas con los plasmidios de amplio rango de hospederos pMMB-pfhaB-prn1 y pMMB-pfhaB-prn2

Para verificar la expresión de los genes *prn1* y *prn2* clonados en el plasmidio pMMB67EH, las construcciones genéticas pMMB-pfhaB-prn1 y pMMB-pfhaB-prn2

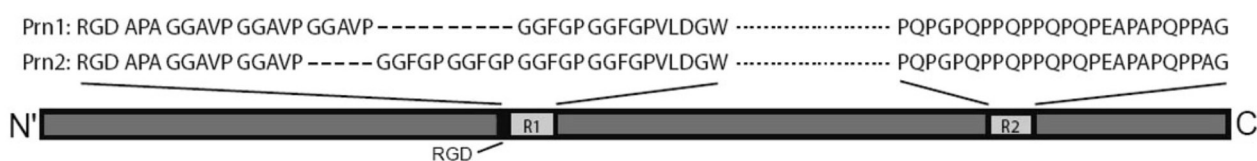


Fig. 3. Representación esquemática de la secuencia aminoacídica de las variantes polimórficas Prn1 y Prn2. Se señalan las regiones variables R1 y R2, y el motivo de unión RGD. Las variantes difieren en dos aminoácidos, además, Prn2 contiene una secuencia repetitiva adicional.

fueron introducidas por conjugación en la cepa de B1686, tal y como fue descrito en los Materiales y Métodos. De esta transformación fueron obtenidas las cepas B1686/pMMB-pfhaB-prn1 y B1686/pMMB-pfhaB-prn2. La cepa B1686 es un mutante incapaz de expresar Prn debido a que el gen *prn* del cromosoma bacteriano está interrumpido por el gen de resistencia a Kanamicina. Es válido señalar que los genes *prn1* y *prn2* de estas construcciones se encuentran solo bajo el control de los promotores *pfhaB* y *tac*, de modo que dentro de *B. pertussis* y sin inducir con IPTG, solo es activo el promotor de *pfhaB*.

Expresión de Prn1 y Prn2

La pertactina es uno de los antígenos de *B. pertussis* implicados en la inmunidad protectora de la mayoría de las vacunas acelulares contra la tos ferina.²⁻⁷ En la producción de estas vacunas es necesario disponer de sistemas de elevado nivel de expresión, de modo que tener cepas que produzcan grandes cantidades de los antígenos hace que el proceso de obtención de sus componentes sea más eficiente y económico.

La expresión de pertactina de las cepas transformadas de *E. coli* SM10λpir/pMMB-pfhaB-prn1 y SM10λpir/pMMB-pfhaB-prn2 fue analizada mediante ELISA. En estas cepas los genes *prn1* y *prn2* están solamente regulados por el promotor *tac* porque *E. coli* carece del factor de transcripción BvgA, activador de *pfhaB*. El análisis cualitativo fue efectuado con muestras tomadas en estado de crecimiento exponencial antes de inducir con IPTG y 4 h después de haber inducido, cuando el cultivo se encontraba en estado estacionario de crecimiento. No fue detectada expresión de ninguna de las dos pertactinas antes de inducir. Sin embargo, después de la inducción, fue detectada Prn en el precipitado celular del cultivo, pero no en el sobrenadante, en las dos cepas analizadas. Este resultado sugiere que Prn, como proteína heteróloga en *E. coli*, está asociada a la superficie celular del microorganismo.

En el caso de la expresión en *B. pertussis*, las cepas transformadas B1686/pMMB-pfhaB-prn1 y B1686/pMMB-pfhaB-prn2 expresaron mayor cantidad de Prn que las cepas salvajes analizadas Bp165 y Bp8132(Tohama) (Fig. 4). Para normalizar y comparar los resultados, los valores fueron expresados en términos de concentración de pertactina por unidad de absorbancia ($\mu\text{g/mL}/\text{DO}$). Según el análisis estadístico realizado, fueron encontradas diferencias significativas entre la cantidad de pertactina expresada por las cepas transformadas y la cantidad expresada por las cepas salvajes. Por otra parte, no fueron encontradas diferencias entre los valores de expresión de las cepas transformadas.

Las cepas B1686/pMMB-pfhaB-prn1 y B1686/pMMB-pfhaB-prn2 expresaron entre 203,36 y 227,17 $\mu\text{g/mL}$ de Prn por unidad de DO (Fig. 4), o sea, entre 11 y 23 veces más Prn que las cepas salvajes Bp165 y Bp8132(Tohama), cuyos valores de expresión fueron 16,82 y 10,36 ($\mu\text{g/mL}/\text{DO}$), respectivamente. Se ha observado con anterioridad que en las condiciones de cultivo utilizadas (medio Bordet-Gengou), alrededor del 95 % de la pertactina detectada por ELISA se libera al medio de cultivo y el resto permanece asociado a la superficie bacteriana.

Los niveles superiores de expresión obtenidos en este estudio pueden estar relacionados con dos aspectos fundamentales de las construcciones genéticas realizadas. El primero de ellos es el hecho de haber insertado el gen *prn* (*prn1* y *prn2* indistintamente) bajo el control del promotor *pfhaB*, que es un promotor fuerte que se activa casi de manera constitutiva porque tiene gran afinidad

Expresión de Prn en cepas de *B. pertussis*

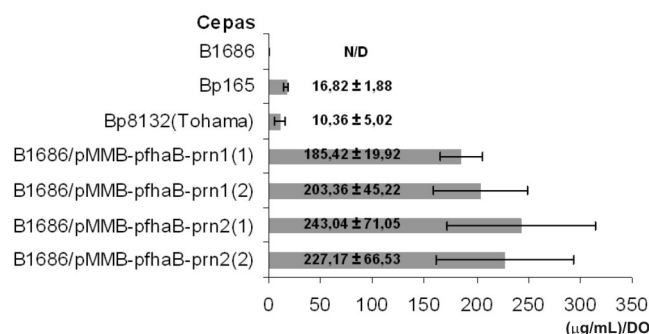


Fig. 4. Niveles de expresión de Prn en cepas de *B. pertussis*, determinados por ELISA. Las barras representan la concentración de antígeno expresado por unidad de DO de cada una de las cepas del eje Y. Los valores del promedio y de la desviación estándar de cada barra se señalan en negrita. N/D: valor no detectado por el ensayo.

por el factor de transcripción BvgA. El otro aspecto que pudiera contribuir a los resultados es que el gen *prn* bajo el control de este promotor está insertado en un plasmidio, de modo que habrá mayor número de copias del gen que en una cepa natural, con una sola copia por cromosoma. La activación relativamente simultánea de todas estas copias en principio produciría una mayor expresión de Prn.

CONCLUSIONES

El clonaje de los genes *prn1* y *prn2* en el plasmidio de amplio rango de hospederos pMMB67EH y bajo el control de los promotores *pfhaB* y *tac*, permitió la expresión extracromosomal de las proteínas Prn1 y Prn2 en cepas de *E. coli* y *B. pertussis*. En las cepas de *E. coli* obtenidas SM10λpir/pMMB-pfhaB-prn1 y SM10λpir/pMMB-pfhaB-prn2 fueron detectadas las proteínas Prn1 y Prn2 asociadas a la superficie celular en cultivos inducidos con IPTG. Por su parte, las cepas de *B. pertussis* transformadas B1686/pMMB-pfhaB-prn1 y B1686/pMMB-pfhaB-prn2 expresaron entre 203,36 y 227,17 $\mu\text{g/mL}$ de Prn por unidad de DO, o sea, entre 11 y 23 veces más Prn que las cepas salvajes analizadas Bp165 y Bp8132(Tohama), por lo que constituyen candidatos adecuados para producir este antígeno como componente de una vacuna acelular contra pertussis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. Ann Inst Pasteur. 1906;20:731-741.
- Cherry JD, Gornbein J, Heininger U, Stehr K. A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. Vaccine. 1998;16(20):1901-1906.
- Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L, Olin P. Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. Vaccine. 1998;16(20):1907-1916.
- Gustafsson L, Hallander HO, Olin P, Reizenstein E, 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(6):349-355.
- Sheu GC, Wo YY, Yao SM, Chou FY, Hsu TC, Ju CL *et al.* Characteristics and potency of an acellular pertussis vaccine composed of pertussis toxin, filamentous hemagglutinin, and pertactin. J Microbiol Immunol Infect. 2001;34(4):243-251.
- Chuprinina RP, Alekseeva IA, Ozeretskovskii NA. [Prophylaxis of pertussis: development and use of acellular pertussis vaccine]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2006;(1):99-105.
- FDA. New whooping cough vaccine for adolescents and adults. FDA. Consum 2005;39(5):6.

8. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great scape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998;6:370-378.
9. Hijnen M, van Gageldonk PG, Berbers GA, van Woerkom T, Mooi FR. The *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin retains its immunological properties after overproduction in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):106-112.
10. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-382.
11. He Q, Makinen J, Berbers G, Mooi FR, Viljanen MK, Arvilommi H *et al.* *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J Infect Dis.* 2003;187:1200-1205.
12. Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M *et al.* Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene.* 1986;48:119-131.
13. Cotter PA, Jones AM. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.* 2003;1(8):367-373.
14. Roy CR, Falkow S. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol.* 1991;173(7):2385-2392.
15. Boucher PE, Maris AE, Yang MS, Stibitz S. The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell.* 2003;11(1):163-173.
16. Boucher PE, Yang MS, Schmidt DM, Stibitz S. Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2001;183(2):536-544.
17. Dower WJ, Millar JE, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:6127.
18. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von König CH, Hoet B, Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(3):174-181.

TALLER DE CULTURA CIENTÍFICA “CIENCIA EN LENGUA DIARIA” Ciudad de La Habana, 15 al 17 de julio de 2010.

En el contexto de las actividades para conmemorar el XXV aniversario de la creación del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales (IMRE), la Cátedra de Cultura Científica *Félix Varela* de la Universidad de la Habana y las Brigadas Técnicas Juveniles, con el auspicio de la Facultad de Física, el IMRE y la Universidad de la Habana, convocan al Taller de Cultura Científica “Ciencia en lengua diaria”.

El Taller constituirá un espacio para la presentación y el debate de proyectos y experiencias sobre la utilización de espacios comunitarios con el fin de promover el interés de niños y adolescentes por el estudio de las ciencias naturales y exactas, y para contribuir a elevar la cultura científica de la población como parte de la cultura general e integral del pueblo. En ese sentido, en curso del 2010, que ha sido declarado por la UNESCO como “Año del acercamiento entre las culturas”, el Taller se proyecta en función de acortar la distancia entre la cultura “tecnológica” de un lado y la “humanística” del otro, mediante acciones que tributen a integrar saberes propios de la ciencia y la tecnología a los saberes que de un modo u otro forman parte de la cultura popular.

Los trabajos se expondrán en forma de presentaciones orales y carteles (posters). Habrá conferencias sobre temas de divulgación de la ciencia y la tecnología a cargo de especialistas de reconocido prestigio en cada materia.

Temas

- Parques y plazas de ciencia y tecnología.
- Ferias científicas.
- Llevando la ciencia a las escuelas.
- Rescatando los círculos de interés.
- Los concursos infantiles como medio de divulgación de las ciencias.

Homenaje

Se realizará una sesión dedicada especialmente a la divulgación de la Astronomía y se exhibirá la exposición *Antonio Rezende Guedes In Memoriam*, como homenaje a ese astrónomo brasileño, desaparecido el 7 de enero del presente año, que fue entusiasta colaborador del Observatorio Astronómico de la Universidad de la Habana. En ese contexto se inaugurará un reloj solar en el IMRE.

Comité organizador

Edwin Pedrero González (Universidad de la Habana), Presidente.
Teresa Viera Hernández (Brigadas Técnicas Juveniles), Vicepresidenta.
Gerlín Quintana Dolz (Universidad de la Habana), Secretaria.
Mónica de la Guardia Durán (Universidad de la Habana).
Antonio Berazaín Iturralde (Instituto Superior de Diseño Industrial).
Carlos Sifredo Barrios (Ministerio de Educación).
Margarita Muguruza Silva (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente).

Comité académico

Carlos Rodríguez Castellanos (Universidad de la Habana), Presidente.
Ernesto Estévez Rams (Universidad de la Habana), Vicepresidente.
Ernesto Altshuler Álvarez (Universidad de la Habana), Vicepresidente.

Contacto

Cátedra de Cultura Científica “Félix Varela” de la Universidad de la Habana (ccc@imre.oc.uh.cu).