



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR; CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA TOXINA A DE CEPAS SILVESTRES DE *Staphylococcus aureus*

Tania Siqueiros-Cendón, Lourdes Ballinas-Casarrubias, Carmen González-Horta, Rocío Infante-Ramírez, Quintín Rascón-Cruz, Gilberto Erosa de la Vega. Cd. Universitaria s/n. Apdo. Postal 1542-C. Chihuahua, Chih.
Fax: 6144144492. tsiqueiros@uach.mx

Palabras clave: *S. aureus*, enterotoxinas, Superantígenos.

Introducción. *Staphylococcus aureus* es una bacteria productora de una amplia gama de exoproteínas entre ellas las enterotoxinas estafilococales (SE's) de las cuales se conocen de la A hasta la U; siendo la toxina A la más tóxica de todas y responsable del 80% de las intoxicaciones alimentarias por SE's. Su función principal es inhibir la respuesta inmune del huésped. Son conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAgs) por lo que son potentes agentes eméticos además de estimular la proliferación de linfocitos T, sin considerar la especificidad antigénica de las células. Los PTSAgs forman complejos moleculares con MHC II y TcR (1).

Estudios moleculares de las SE's muestran que la antigenicidad y la capacidad de causar daños esta determinada por partes separadas de la proteína. También, que las modificaciones estructurales son importantes para controlar su función (2).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente el gen de la toxina A de cepas silvestres de *S. aureus* mediante secuenciación y predicción de su estructura, clonar y expresar el gen que codifica para la enterotoxina A de *S. aureus* en *E. coli*.

Metodología. Se trabajó con cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* (3). Se diseñaron dos juegos de iniciadores para amplificar el gen completo de la toxina A. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (4). Se buscaron similitudes entre los genes con los programas Clustal X y GeneDoc para poder predecir diferencias en estructura secundaria y terciaria implicadas en la respuesta inmunológica. Se encontró un gen con modificaciones en sitios específicos de reconocimiento a TcR; dicho gen fue clonado en pSPORT2 y expresado en *E. coli* DH5 α . Los plásmidos fueron caracterizados con las enzimas de restricción PstI, DraI, EcoRI, HindIII y RsaI. La expresión de la toxina A se monitoreó con análisis de Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-toxina A de *S. aureus* (Fig.1).

Resultados y discusión. Las cepas silvestres de *S. aureus* presentaron algunas variedades con respecto a las reportadas en la base de datos NCBI.

La variedad de la toxina que fue secuenciada y clonada, según la predicción de su estructura, tienen modificados aminoácidos involucrados directamente con la unión a MHC II y a TcR.

Se logró clonar y caracterizar la orientación del inserto de 1000pb en *E. coli*; Con respecto a la expresión, se detectaron, con un MAb anti-sea, una proteína de 30 kDa y

una de 60 kDa que puede corresponder a un dímero de la proteína.



Fig. 1. Análisis por Western Blot. 1.MPM BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder.

2 y 3. Ctl (-) *S. aureus* 4 y 5. ctl (+) *S. aureus*. 6 y 7. *E. coli* con inserto 8. *E. coli* DH5 α solo 9. DH5 α con vector

Conclusiones. La variedad de la toxina que fue secuenciada y clonada, según la predicción de su estructura, tienen modificados aminoácidos involucrados directamente con la unión a MHC II y a TcR.

Es por ello que se están llevando a cabo estudios preliminares para definir de manera experimental el efecto de las mutaciones encontradas sobre la virulencia de la toxina y a su vez evaluar su potencial uso como inmunógeno o toxoide.

Agradecimiento. Este proyecto fue financiado por la Secretaria de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UACH.

Bibliografía

- (1) Dinges M, Orwin P, y Schlievert P. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 (1), 16-34.
- (2) Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E y Proft T. (2000) Superantigens-powerful modifiers of the immune system. *Molecular Medicine Today*. 6, 125-131.
- (3) Reyes J. (2004) Frecuencia de Cepas de *Staphylococcus aureus* Enterotoxigénicas, en la Ciudad de Chihuahua. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. 76p.
- (4) Perkin-Elmer Corporation. (1998) Automated DNA sequencing. Chemistry Guide. PE Applied Biosystems.