



PRODUCCIÓN DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA TERMOLÁBIL DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA EN LECHUGA (*Lactuca sativa* L.).

Luzmila González-Martínez, Sergio Rosales-Mendoza, Areli Herrera-Díaz, Rubén López-Revilla y Ángel G. Alpuche-Solís.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a La Presa San José 2055, C.P. 78216, San Luis Potosí, S.L.P. Tel. (444) 8342000, alpuche@ipicyt.edu.mx.

Palabras clave: *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Lactuca sativa* L., subunidad B de toxina termolábil.

Introducción. La biotecnología moderna se ha valido de las técnicas moleculares para plantear el desarrollo de nuevas terapias y vacunas. Este es el caso de las vacunas basadas en plantas, aplicación que propone el uso de vegetales transgénicos para la producción de proteínas antigénicas heterólogas (1). *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) causa miles de muertes al año a nivel mundial y los altos costos de producción de las vacunas acelulares en desarrollo han frenado su inclusión en el programa básico de vacunación de la OMS. Estas formulaciones incluyen la subunidad B de la toxina termolábil (LTB), la cual se ha caracterizado como un antígeno protector e inocuo (2).

En la búsqueda de vacunas comestibles contra ETEC, varios autores han producido LTB en modelos como tabaco, papa y maíz, probándose que la proteína es funcional (1). Los aspectos que buscan mejorarse en los sistemas vegetales son: 1) emplear sistemas más atractivos, como aquellas plantas que se consuman crudas; 2) lograr mayores niveles de expresión, ya sea mediante el uso de genes sintéticos o señales de retención (1).

La meta de este proyecto fue expresar un gen sintético de LTB en lechuga y evaluar los niveles de LTB alcanzados.

Metodología. Se empleó un gen sintético de LTB optimizado al que se añadió la señal SEKDEL en el extremo 3', para dirigir el péptido a retículo endoplásmico. Éste fue clonado en el vector binario pBI121 y la construcción se introdujo a la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* por electroporación. Se transformaron hojas cotiledonarias de lechuga de acuerdo a condiciones previamente descritas (3). Las líneas que se regeneraron en el proceso de selección fueron analizadas por PCR para el gen *nptII*. Posteriormente se cuantificó LTB en extractos de proteína soluble mediante un ensayo de ELISA dependiente de GM1 (receptor natural de LTB pentamérica).

Resultados y discusión. Se obtuvieron 30 líneas candidatas de las cuales 24 resultaron positivas por PCR. Los niveles de expresión más altos de la proteína recombinante determinados por ELISA fueron de 0.07% respecto a la proteína total soluble (PTS) (Figura 1), lo cual confirma que la proteína es ensamblada en su forma pentamérica. Los resultados son superiores a los alcanzados por otros sistemas en los que se emplea el gen nativos sistemas en los que se emplea el gen nativo que fueron de 0.0015% PTS (1). Las líneas positivas por ELISA se han desarrollado hasta la etapa de floración y la progenie ha sido germinada en medio

selectivo. Actualmente estamos en la etapa de identificar plantas homocigotas para el transgén y determinar el número de copias mediante ensayos de Southern blot.

Se realizarán ensayos de inmunización por vía oral en ratones y se medirá la respuesta inmune humoral inducida por la proteína heteróloga.

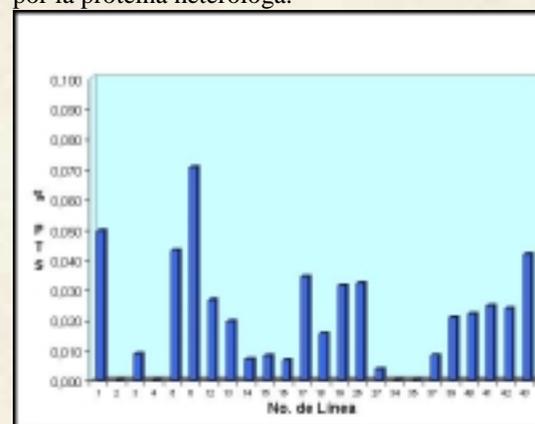


Figura 1. Niveles de expresión de LTB en transformantes primarias de lechuga. El ensayo fue realizado por ELISA dependiente de GM1.

Conclusiones. Las líneas transgénicas de lechuga expresan la proteína LTB la cual se ensambla en su forma pentamérica y sus niveles son superiores en casi dos órdenes de magnitud a los alcanzados con un gen nativo.

Agradecimiento. Al CONACYT por la beca de doctorado y el financiamiento otorgado al proyecto 37048-B. Al Dr. John Clements por proporcionar el estándar de LTB para los ensayos de ELISA.

Bibliografía.

- Mason, H, Warzecha, H, Mor, T y Arntzen, C. (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Mol Med.* 8: 324-329.
- New frontiers in the development of vaccines against ETEC and EHEC *E. coli* infections. (1999). *Weekly Epidemiological Record*, 74(14):105-112.
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, Laat AMM y Davey MR. "Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*". *J Exp Bot.* 45: 1441-1449. (1994).