

Clonación del gen quimera tv70catl de trypanosoma vivax en un sistema bacteriano

Maryori Correia

Universidad Central de Venezuela
carolinacoreia_1@hotmail.com
Venezuela

Bernardo H. Gonzalez

Laboratorio de Biología Molecular
Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
Universidad Simón Rodríguez
Venezuela

Fecha de recepción : 19 - 03 - 2019 - Fecha de aceptación: 07- 04- 2019

Resumen

La tripanosomosis animal es una enfermedad parasitaria hemotrópica causada principalmente por *Trypanosoma vivax* (*T.vivax*), que ocasiona pérdidas económicas importantes en la ganadería venezolana. Hasta la fecha, el serodiagnóstico de la enfermedad está limitado por la ausencia de antígenos específicos para la identificación de *T. vivax*. La clonación de genes quimera de *T. vivax*

no ha sido reportado hasta el momento y podrían ser la clave en el desarrollo de estrategias inmunoprotectivas para el control de esta enfermedad. Un gen quimera constituido por la unión de la región catalítica de la Cistein proteasa con la región de la Hsp70359-610 de *T. vivax*, fue clonado. Para ello, se realizó la extracción del vector pPiczaA y se digirió con enzimas de restricción *EcoRI* y *NoTI*, obteniéndose la liberación del gen *Tv70CatL* de 1478 pb. Poste-

riormente, se ligó al vector de expresión pET28a y se transformó en cepas de *E. coli* B121 (DE3) por electroporación. Las colonias fueron analizadas por PCR, siendo positiva la amplificación. Luego, el producto fue digerido con enzimas de restricción *EcoRV* y *PstI* verificando así la secuencia de la molécula recombinante.

Palabras clave: clonación; quimera; trypanosoma vivax, Tv70CatL

Cloning of the chimera gene tv70catl of trypanosoma vivax in a bacterial system

Abstract

Animal trypanosomosis is a hemotropic parasitic disease caused mainly by *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*), which causes significant economic losses in Venezuelan livestock. To date, the serodiagnosis of the disease is limited by the absence of specific antigens for the identification of *T. vivax*. The cloning of *T. vivax* chimera genes has not been reported so far and could be the

key in the development of immunoprotective strategies for the control of this disease. A chimera gene constituted by the binding of the catalytic region of the Cistein protease to the region of the Hsp70359-610 of *T. vivax* was cloned. For this, the pPiczaA vector was extracted and digested with restriction enzymes *EcoRI* and *NotI*, obtaining the release of the Tv70CatL gene of 1478 bp. Subsequently, it was ligated to the expression vector pET28a and

transformed into strains of *E. coli* BL21 (DE3) by electroporation. The colonies were analyzed by PCR, with amplification being positive. Then, the product was digested with restriction enzymes *EcoRV* and *PstI* thus verifying the sequence of the recombinant molecule.

Key words: Cloning; chimera; *Trypanosoma vivax*; Tv70CatL

Introducción

La tripanosomosis animal es una enfermedad parasitaria hemotrópica, causada principalmente por agentes del género *Trypanosoma*. En Venezuela, es ocasionada principalmente por *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*), un hemoflagelado unicelular eucariota, que afecta a ovinos, bovinos y caprinos (Dávila y Silva, 2000). La enfermedad se caracteriza por la presencia intermitente de parásitos en sangre, fiebre intermedia y un cuadro agudo de anemia, además de presentar pérdida en la condición corporal, emaciación, abortos y esterilidad (Suárez y col., 2009).

La hemoparasitosis en bovinos constituye uno de los principales factores limitantes en el desarrollo de la ganadería en América Latina, representado por un 40% de la tasa de mortalidad total del ganado (Desquesnes, 2004). Esto genera una disminución en la producción de carne y leche de bovinos, afectando directamente a la población consumidora (Rivera, 1996; García y col., 2002). De allí la necesidad de optimizar los sistemas de diagnóstico, así como de obtener nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

Entre las técnicas empleadas para el serodiagnóstico de *T. vivax* tenemos el ELISA indirecto (Ferenc y col., 1990; Vos y Gardiner, 1990), sin embargo, la estandarización de un antígeno específico no ha resultado sencilla. En primer lugar, en Venezuela, no hay presencia de cepas de *T. vivax* que puedan reproducirse en ratas o ratones, los cuales son modelos animales ideales para la producción de parásitos en condiciones

experimentales.

Algunos laboratorios emplean extractos de *T. evansi* como antígeno para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina en sueros de animales de campo (Uzcanga y col 2002). Si bien el empleo de antígenos de *T. evansi* para el reconocimiento de *T. vivax* puede ser una herramienta ventajosa para el diagnóstico de este parásito, debido a que se pueden obtener grandes cantidades de parásitos con relativa facilidad, hay que considerar que recientemente se ha detectado por PCR la presencia de *T. evansi* en bovinos en Venezuela (Gonzatti y col., datos no publicados).

Una estrategia para mejorar la obtención de antígenos específicos es por medio de la clonación y expresión de proteínas recombinantes del patógeno de interés. Bannai y col, en 2003 clonaron y expresaron la proteína de choque térmico mitocondrial de 70 kDa (MTP) de *Trypanosoma congolense* como antígeno para el desarrollo de un ELISA indirecto. El ensayo demostró la presencia de anticuerpos anti-MTP en sueros de ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma congolense*.

Con relación al control de la enfermedad, el empleo de drogas tripanocidas ha sido la principal estrategia utilizada, pero los problemas de costos, toxicidad y resistencia que ha producido su empleo, hace necesario el diseño de estrategias inmunoterapéuticas que permitan generar una respuesta inmune efectiva por parte del hospedador ante una eventual infección por éste patógeno. El uso de vacunas convencionales implementadas en tratamientos contra la enfer-

medad, no ha proporcionado resultados efectivos debido a la capacidad que posee *T. vivax* para evadir la respuesta inmune del hospedador, por lo que, el diseño y construcción de quimeras con propiedades inmunogénicas y adyuvantes, podrían ser una alternativa viable para el serodiagnóstico y/o el control de esta enfermedad.

Se ha reportado que la Hsp70 posee propiedades moduladoras cuando es utilizada como adyuvante en las inmunizaciones (Carmelo, 2006) y puede ser utilizada como blanco para serodiagnóstico (Bannai y col., 2003). Además, diversos trabajos muestran que genes quimera formados con la Hsp70 y otra proteína inmunogénica producen una elevada respuesta protectora ante enfermedades como la enfermedad de Chagas (Planelles y col., 2001; Morell y col., 2006) y la Leishmaniasis (González y col., 2004). Por otra parte, las cisteín proteasas han sido estudiadas como marcador de serodiagnóstico y blanco de drogas terapéuticas debido a su propiedad inmunogénica (Authie y col, 2001; Sajid y Mckerrow, 2002).

En el laboratorio, se clonó en un sistema bacteriano, para su futura expresión el gen quimera denominado *Tv70CatL* constituido por la región C-terminal de unión al péptido de la Hsp70 y la región catalítica de la Cisteín proteasa, ambas de *T. vivax*. Para ello, se realizó una extracción del ADN plasmídico pPICZaA/*Tv70CatL* y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* para obtener el gen *Tv70CatL*. Seguidamente, este gen se ligó al vector de expresión pET28a y se incorporó en una célula de *E. coli* BI21 (DE3) por electroporación.

Las colonias obtenidas, fueron seleccionadas bajo el método de selección por antibiótico, y verificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de las colonias y por el corte con las enzimas de restricción *EcoRV* y *PstI*.

Metodología

Gen *Tv70CatL*.

El clon del gen *Tv70CATL*, está constituido por una región C-terminal de

756 pb de la *Hsp70*, la cual incluye al dominio de unión al péptido y por la región catalítica de la *Cistein* proteasa de *T.vivax*, transformado en células de *E. coli* TOP10 con el vector pPICZαA.

Extracción del plásmido pPICZαA/*Tv70CatL*.

Para la extracción del plásmido se empleó el kit comercial Miniprep Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System de Promega.

Digestión del plásmido pPICZαA/*Tv70CatL* con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*.

Para extraer el gen *Tv70CatL* del vector pPICZαA se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. Para ello, se realizó la mezcla de reacción como se observa en el Tabla 1. La mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas. Finalmente, las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 0.8%.

Tabla 1. Reactivos usados en el corte con enzimas de restricción del vector pPICZαA/*Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μL)
Buffer H	5
BSA	0.5
<i>EcoRI</i>	0.5
<i>NotI</i>	0.5
ADN	20
H ₂ O	23.5
Volumen final	50

Obtención de los clones *pET28a/Tv70CatL*

El gen *Tv70CatL* se insertó en el vector de expresión pET28a. Para ello, el gen y el vector de expresión fueron purificados por minicolumnas, utilizando el estuche comercial WizardR SV Gel

and PCR clean-Up System Promega. La ligación del inserto con el vector se realizó por medio de la formación de extremos cohesivos con la digestión de las enzimas *EcoRI* y *NotI*. El protocolo utilizado para la ligación fue el descrito por la casa comercial kit Novagen (Tabla 2). La mezcla se incubó a 4 °C du-

rante toda la noche. Una vez obtenida la molécula recombinante esta se incorporó en células de *E. coli* BL21 (DE3) por el método de electroporación. Las colonias recombinantes fueron seleccionadas por el método de selección por resistencia a un antibiótico.

Tabla 2. Reactivos usados en la ligación entre el vector *pET28a* y el gen *Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μ L)
Buffer 2X rapid ligation Buffer T4 ADN ligasa	2
Vector pET28a	1
Inserto <i>Tv70CatL</i>	3
T4 ADN ligasa (3U/ μ L)	1
H ₂ O estéril	3
Volumen Final	10

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR de las colonias)

Las colonias recombinantes fueron analizadas por PCR [25 μ L de la mezcla que contiene Buffer 1X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; cebadores (0,2 μ M c/u); Taq polimerasa 1U/ μ L]; condiciones de la PCR: 1 ciclo (95 °C, 5 min); 33 ciclos (95 °C, 1 min; 64 °C, 1 min; 72 °C, 2 min); 1 ciclo (72 °C, 10 min] con los cebadores:

(1) *Hsp70*₃₅₉₋₆₁₀ (5'ATGATGAATCCGGCAAGGAAGTGAACAAGAGC 3'; sentido)

(2) *Tv70Rc* (5'AGGAAGCGGCCGCGCCACCAACAACAGCAC 3'; antisentido)

Extracción del plásmido pET28a/*Tv70CatL*.

Se realizó la extracción del ADN plasmídico de las colonias que resultaron positivas por PCR. Para la extracción del plásmido se empleó el kit comercial Miniprep Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System de Promega. Corte con las enzimas de restricción *EcoRV* y *pStI* al vector pET28a/*Tv70CatL*.

Se obtuvo los mapas de restricción del gen que codifica la *Tv70CatL* y del vector pET28a, mediante el uso del programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Una vez obtenido los mapas de restricción, se seleccionó el ADN plasmídico de la colonia 5 y se procedió a su digestión con las enzimas de restricción *EcoRV* y *PstI*, de acuerdo con las condiciones mostradas en la Tabla 3. La mezcla se incubó a 37 °C durante 3 horas. Finalmente, las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 0.8%

Tabla 3. Reactivos usados en la mezcla para realizar el corte con la enzima de restricción *EcoRV/PstI* del ADN plasmídico *pET28a/Tv70CatL*.

Reactivos	Volumen (μ L)
Buffer E	3
BSA	0.3
<i>EcoRV</i>	0.5
<i>PstI</i>	0.5
ADN	15
H ₂ O	10.7
Volumen final	30

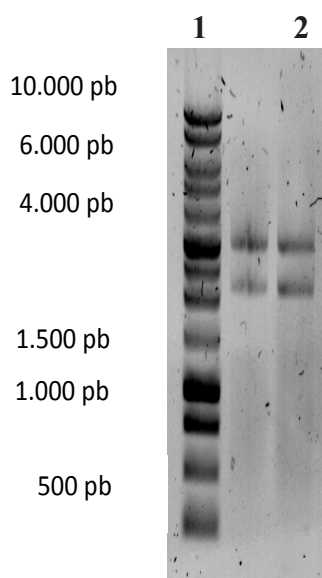
Resultados y Discusiones

Para la obtención del gen de interés *Tv70CatL* se procedió a realizar una extracción del ADN plasmídico del vector recombinante *pPICZ α A/Tv70CatL*. En la Figura 1, se muestra la corrida

electroforética del plásmido recombinante *pPICZ α A/Tv70CatL*, obtenidos a partir de la colonia 6 transformantes en células TOP10, ya que esta fue positiva por medio de una PCR con los cebadores *Hsp70_{359-610F} /Tv70RcR* (Datos no mostrados). En el carril 2 se observa

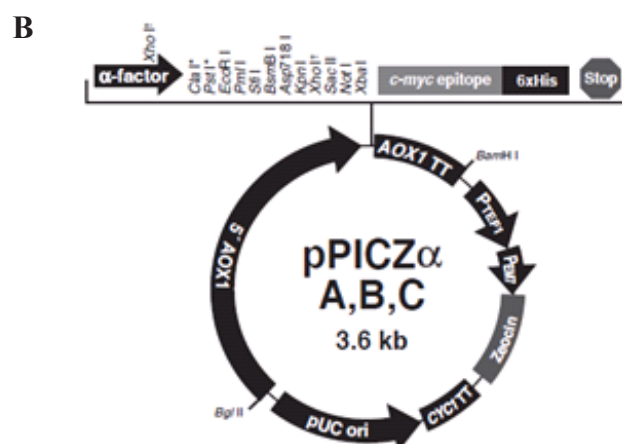
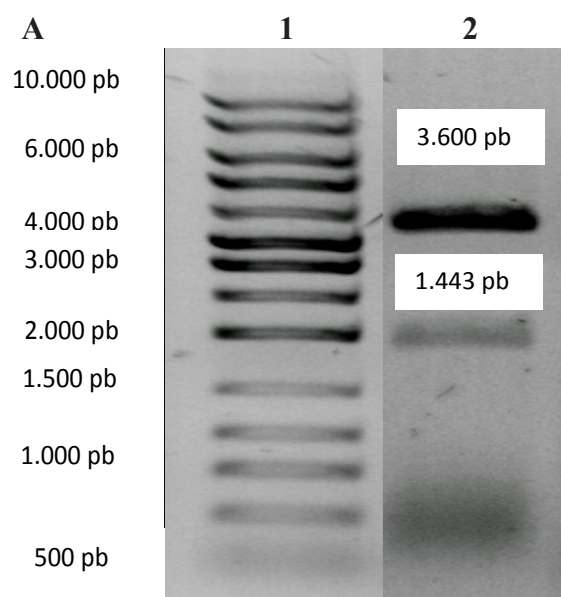
un patrón de bandas correspondientes al ADN plasmídico, una vez extraído el plásmido, se procedió a la digestión del plásmido recombinante *pPICZ α A/Tv70CatL* con enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* para la liberación del gen *Tv70CatL*.

Figura 1. Gel de agarosa (0,8%) en buffer TAE 1X teñido con syber safe. Integridad del vector pPICZ α A/Tv70CatL. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb (Axygen); carril 2: ADN plasmídico de una colonia.



En la Figura 2A, se muestra la digestión del plásmido observándose una banda de 1.478 pb que coincide con el tamaño esperado, de acuerdo con su secuencia nucleotídica. Además, se observa una banda de 3.600 pb, correspondiente al tamaño del vector pPICZ α A (Figura 2B).

Figura 2. Gel de agarosa (0,8%) en buffer TAE 1X teñido con syber safe. A) Digestión del ADN plasmídico, que contiene el gen Tv70CatL, con las enzimas EcoRI y NotI. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Axygen); carril 2: Digestión del ADN plasmídico con E.

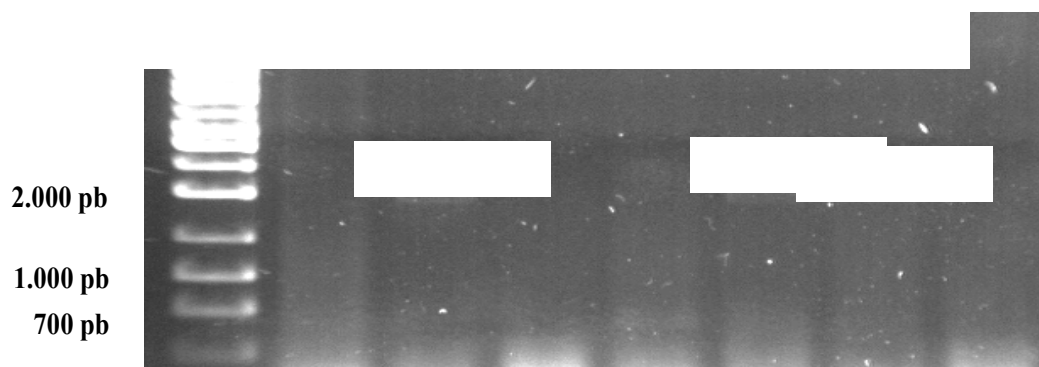


Posteriormente, para la clonación y futura expresión del gen *Tv70CATL*, se procedió a su ligación en el vector de expresión pET28a, ya que este vector presenta un promotor fuerte para el fago T7, donde la habilidad que presenta de transcribir la ARN polimerasa T7 es ocho veces mayor que la de ARN polimerasa de *E. coli* (Lee y col., 2008). La ligación se realizó por medio de la formación de extremos cohesivos,

y esta fue incorporada en la célula *E. coli* BL21 (DE3). Para la selección de las colonias recombinantes, se utilizó el método de selección por resistencia a un antibiótico (Luque, 2008), en este caso a kanamicina, ya que el vector pET28a contiene un gen de resistencia a dicho antibiótico. Se obtuvo 10 colonias blancas, las cuales fueron estudiadas por una PCR con los cebadores *Hsp70*_{359-610F}/*Tv70RcR*, donde solo 3 colonias resul-

taron positivas (Figura 3). El resto de las colonias que resultaron negativas en la PCR y que crecieron en presencia del antibiótico kanamicina, probablemente fue debido a que no hubo ligación del gen con el vector (Luque, 2008) o a la presencia de algún agente contaminante que pudiese arrojar falsos positivos, el cual es un problema común en las transformaciones bacterianas (McPherson y col., 2006).

Figura 3. Gel de agarosa (0,8%) en buffer TAE 1X teñido con syber safe. PCR de las colonias obtenidas de la transformación del vector recombinante pET28a/*Tv70CatL* con los cebadores *Hsp70*_{359-610F}/*Tv70RcR*. Carril 1: Marcador de peso molecular 1Kb (Axygen); carril 2.

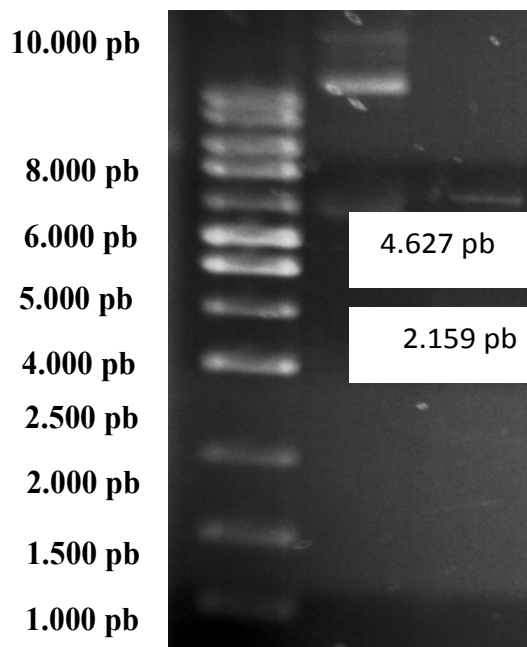


Una vez obtenidas las colonias recombinantes, se realizó una extracción del ADN plasmídico (Figura 4) y se seleccionó el ADN de la colonia 5, ya que se obtuvo mayor cantidad de ADN durante la extracción de la misma. Pos-

teriormente, se realizó un corte con las enzimas de restricción *EcoRV* y *PstI* las cuales cortan al vector recombinante en dos fragmentos de tamaños conocidos. El corte produjo la hidrólisis del enlace fosfodiéster de cada hebra ocasionando

así la ruptura del vector recombinante en dos fragmentos, 4.627 pb y 2159 pb respectivamente, los cuales concuerdan con los tamaños esperados de acuerdo al análisis de restricción realizado.

Figura 4 . Gel de agarosa (0,8%) en buffer TAE 1X teñido con syber safe. Digestión del ADN plasmídico pET28a/Tv70CatL con las enzimas PstI y EcoRV. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb (Axygen); carril 2: ADN plasmídico de la colonia 5; carril 3: Digestión



La obtención y clonación del gen *Tv70CatL* es el paso inicial para la obtención de la proteína quimera *Tv70CatL*. Actualmente, se está realizando la expresión de esta proteína dentro del vector de expresión pET28a en un sistema bacteriano. Se espera optimizar su expresión bajo este sistema, y posteriormente, realizar ensayos inmunológicos que permitan analizar su potencial para el diagnóstico y/o su posible empleo como inmunógeno para el control de la tripanosomosis bovina en Venezuela.

Conclusiones

Se obtuvo 3 colonias recombinantes positivas (5,8 y 9) en la PCR de las colonias, verificándose la ligación y pos-

terior clonación del gen *Tv70CATL* de 1478 pb en el vector de expresión pET28a.

Agradecimientos

Agradezco al Plan piloto para el fortalecimiento de servicios sanitarios de diagnóstico y tratamiento de hemoparásitos de interés veterinario. Ministerio del Poder Popular para la Educación Universitaria Ciencia y Tecnología, por su colaboración para la realización de este trabajo.

Le agradezco a todo el grupo de inmunobiología del IDECYT por sus consejos, ayuda y paciencia durante la elaboración de este trabajo. En especial, a José David Rosales por estar allí pre-

sente y aclarar dudas. Gracias infinitas a todos.

Referencias Bibliográficas

- Dávila, A., Silva, R. (2000). Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann N. y Acad Sci.* 916: 199-212.
- Suárez, C.; García, F.; Román, D.; Coronado, A.; Perrone, T.; Reyna, A.; Parra, N. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Trop.* 27(4): 363-372.

- Desquesnes, M. (2004). Ivestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. World organization for animal health. 174pp.
- Rivera, M. (1996). Hemoparasitosis Bovinas. Universidad Central de Venezuela.
- García, F., Suarez, C., Daza, E., Simoes, D., Rivera, M. (2002). Brotes causados por *Trypanosoma vivax* en rebaños de caprinos y ovinos del estado Falcón, Venezuela.
- Ferenc, S., Stopinski, V., Courtney, C. (1990). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the Eastern Caribbean Basin, *Int J Parasitol.* 20(1): 51-56.
- Vos, G., Gardiner, P. (1990). Antigenic relatedness of stocks and clones of *Trypanosoma vivax* from east and West Africa, *Parasitology.* 1: 101-106.
- Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P., Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*, *Parasitology.* 3: 287-299.
- Carmelo, E., Zurita, A., González, A., Martínez, E., Valladares, B. (2006). Proteínas de choque térmico en parásitos: La Hsp70 y el sistema inmune. *Revista Ibérica de Parasitología.* 66:1-4.
- Bannai, H., Sakurai T., Inoue, N., Sugimoto, C., Igarashi, I. (2003). Cloning and Expression of Mitochondrial Heat Shock Protein 70 of *Trypanosoma congolense* and Potential use as a diagnostic Antigen. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10:926-933.
- Planelles, L., Thomas, M., Alonso, C., López, M. (2001). DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP-11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect. Immun.* 69:6558-6563.
- González, A., Thomas, M., Martínez, E., Carmelo, E., López, M., Valladares, B. (2004). Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitology.* 128:139-47.
- Morell, M., Thomas C., Caballero, T., Alonso, C., López, M. (2006). The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 24:7046-7055.
- Authie, E., Boulange, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F., Musoke, A. (2001). Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *Int. J. Parasitol.* 31:1429-1433.
- Sajid, M., McKerrow, J. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol and Bioch Parasitology.* 120(1): 1-21.
- Birnboim, H., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 13: 1513-1523. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.
- Luque, J., Herraiz, A. (2008). Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. *Elsevier España.*
- Lee, S., Keasling, J. (2008). Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein Expression and Purification,* 61:197-203.
- McPherson, M., Moller, S. (2006). PCR. Segunda edición. The basic. Cornwall, UK.