

## CLONADO DE GENES DE *Trypanosoma cruzi* EN VECTORES DE EXPRESION Y PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES

Cecilia Anzola de M. <sup>\*2</sup>, Sergio Iglesias <sup>1</sup>, Daniel Sánchez <sup>1</sup>, Alberto C.C. Frasch <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

**Key words:** Chagas'disease, Gene cloning, *Trypanosoma cruzi* antigen.

### RESUMEN

Genes del *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas, fueron clonados en vectores pGEX. La expresión se hizo en *Escherichia coli*, induciendo las proteínas de fusión con IPTG y purificándolas por cromatografía de afinidad con glutation agarosa. Estas proteínas fueron analizadas por electroforesis y cuantificadas por el micrométodo de Bradford.

### ABSTRACT

Genes from *Trypanosoma cruzi*, a parasite responsible for the Chagas'disease, were cloned into pGEX vectors. The expression was done in *Escherichia coli*; the fusion proteins were induced by IPTG and purified by affinity chromatography on glutation-agarose. The proteins were analyzed by electrophoresis and the contents established by the Bradford method.

### INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, causada por el *Trypanosoma cruzi*, es uno de los problemas endémicos más importantes en Centro y Sur América, para lo cual no se dispone de tratamientos quimioterapéuticos o inmunológicos definitivos. Dicha enfermedad puede manifestarse en diferentes formas clínicas y patológicas, cada una con características particulares (1).

El *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo que envuelve diferentes formas del parásito en el vector (insecto) y en el huésped (vertebrado) (2). Su composición antigénica es bastante compleja; sin embargo, se han podido reconocer algunos de los componentes de la superficie del parásito y determinar sus características estructurales y funcionales (3). La mayoría de las proteínas de superficie son posiblemente glicoproteínas debido a su probada afinidad por diferentes lectinas (4). Estas proteínas han sido analizadas por iodación de parásitos enteros (5) o por marcación *in vivo* seguida por inmunoprecipitación con sueros inmuno y de infección (6), cromatografía de afinidad (7) o reacciones con anticuerpos monoclonales (8). Estas técnicas de clonado molecular han posibilitado el acceso a los distintos componentes que intervienen en la interacción del parásito con el huésped y con el vector.

Se han podido aislar grupos de clones diferentes, mediante análisis inmunológico de un banco genómico de *T. cruzi* construido en el vector  $\lambda$  gt 11, utilizando suero de un paciente chagásico (2). Sin embargo, debido a la complejidad de la composición antigénica de dicho parásito, los trabajos actuales están centrados no solo en un mejor entendimiento de la biología

molecular de T. cruzi, sino también en la localización de moléculas que puedan ser aplicadas a problemas prácticos como diagnóstico y vacunación.

Mediante modificaciones del plásmido PSJ 5, que dirige la síntesis de la glutatión transferasa (SJ 26, PM 26000) en E. coli, se han podido obtener plásmidos o vectores pGEX (9), los cuales pueden actuar como vectores de expresión dirigiendo la síntesis de polipéptidos diferentes, fusionados al extremo C-terminal de la proteína SJ 26. Estas proteínas de fusión son solubles en solución acuosa y pueden ser purificadas del lisado bacteriano, en condiciones no desnaturizantes, mediante cromatografía de afinidad en columna.

Con base en lo anterior, se inició el presente trabajo con el propósito de clonar, en vectores de expresión pGEX, algunos de los antígenos de T. cruzi aun no estudiados (N<sup>o</sup> 13,30,36), aislados de una biblioteca genómica construida en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Fundación Campomer en Buenos Aires, Argentina (11) con el fin de inducir y purificar las proteínas de fusión, las cuales pueden llegar a tener aplicaciones en problemas de diagnóstico y vacunación contra la enfermedad de Chagas.

#### MATERIALES Y METODOS

Bacterias E. coli HB 101 fueron transformadas usando el método de CaCl<sub>2</sub> (10), con los vectores pGEX<sub>1</sub>, pGEX<sub>2</sub> y pGEX<sub>3</sub> (4). El DNA plasmídico circular obtenido fue purificado mediante la técnica de equilibrio de centrifugación en gradiente discontinuo de cloruro de cesio-bromuro de etidio (10) y cuantificado por lecturas de absorbancia a 260 nm. Este DNA plasmídico fue cortado con endonucleasas de restricción (EcoR, Sma I) (10) e hidrolizado en el fosfato 5' con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) (10), controlando estos procesos por electroforesis en gel de agarosa 1% que contenía bromuro de etidio (10).

Vectores que contienen la secuencia DNA de los antígenos de T. cruzi 13, 30 y 36 (11) fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI y el DNA purificado por electroforesis preparativa en gel de agarosa 0.7% con bromuro de etidio. Estos insertos fueron ligados al DNA plasmídico obtenido anteriormente, en presencia de T<sub>4</sub> DNA ligasa, a temperatura ambiente durante 3 horas (10). El producto de esta ligación fue utilizado para transformar bacterias competentes de E. coli, dejándolas crecer en medio LB (bactotriptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g en un litro) más agar 1.5%, y ampicilina (100µg/ml) (10).

Estas bacterias, junto con otras transformadas contienen el antígeno A<sub>2</sub> del T. cruzi (Aislado en Suecia), fueron sometidas a un ensayo (screening) (12), para identificar las colonias que expresaban el antígeno de interés. Este análisis se realizó con suero de paciente chagásico (para el antígeno A<sub>2</sub>) y suero de conejo (para los antígenos 13,30 y 36), previamente preadsorbidos con lisado de bacterias, el cual se obtuvo por calentamiento en baño maría a 100°C durante 10 minutos (10). Como indicador de colonias positivas se utilizó la proteína A marcada con <sup>125</sup>I (13), revelando por autorradiografía a -70°C. Las colonias positivas fueron crecidas a gran escala, induciendo la proteína de fusión con isopropil β-D-tiogalacto piranosido (IPTG) 0.1 mM, durante 4 horas a 37°C (9). El sobrenadante obtenido después de la sonicación de las bacterias fue aplicado a una columna de cromatografía de afinidad con glutatión GSH-agarosa (2ml de gel), previamente equilibrada con buffer MTPBS (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4mM pH 7.4) más tritón X-100 1%. La fracción retenida fue eluida con buffer Tris-HCl 50mM pH 8.0 más GSH 5mM. Las fracciones que

contenían la proteína fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) 12.5%, utilizando la técnica de tinción con azul de Croomassie (10) y la de "Western blott" (10) y cuantificadas por el micrométodo de Bradford (13). Estas proteínas purificadas, actualmente se utilizan en ensayos inmunológicos de protección en conejos, contra el *T. cruzi*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las bacterias HB 101 fueron transformadas con los vectores pGEX<sub>1</sub>, pGEX<sub>2</sub> y pGEX<sub>3</sub> y el DNA plasmídico purificado fue resuspendido en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM). Cada uno de estos DNA fue cuantificado en base a las lecturas de absorbancia a 260 nm, obteniéndose 1.5 µg/µl para pGEX<sub>1</sub>, 0.75 µg/µl para pGEX<sub>2</sub> y 1 µg/µl para pGEX<sub>3</sub>. La figura 1 muestra el DNA plasmídico para cada uno de estos vectores, antes y después de la digestión con enzimas de restricción. Inicialmente se observan 3 bandas correspondientes a las diferentes formas que adquiere el DNA (Superenrollado, parcialmente relajado y relajado). sin embargo, al ser digerido adquiere forma lineal (una sola banda).

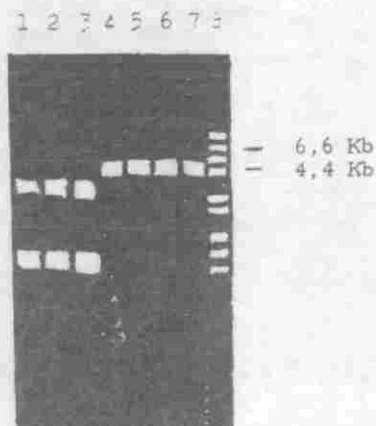


Figura 1

Hidrólisis con enzimas de restricción de los plásmidos pGEX<sub>1</sub>, pGEX<sub>2</sub> y pGEX<sub>3</sub>

1. pGEX<sub>1</sub>
2. pGEX<sub>2</sub>
3. pGEX<sub>3</sub>
4. pGEX<sub>1</sub> cortado por Sma I
5. pGEX<sub>1</sub> cortado por EcoRI
6. pGEX<sub>2</sub> cortado por Sma I
7. pGEX<sub>3</sub> cortado por Sma I
8. Patrones de PM (φ X174 por Hae III + x por Hind III)

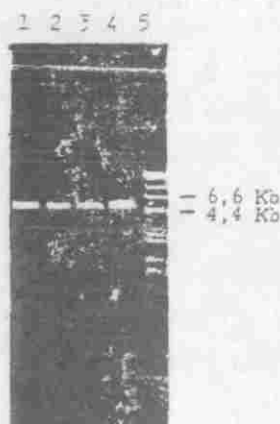


Figura 2

Hidrólisis enzimática (enzima BAP) de los plásmidos pGEX<sub>1</sub>, pGEX<sub>2</sub> y pGEX<sub>3</sub> cortados por enzimas de restricción.

1. pGEX<sub>1</sub> cortado por Sma I
2. pGEX<sub>1</sub> cortado por EcoRI
3. pGEX<sub>2</sub> cortado por Sma I
4. pGEX<sub>3</sub> cortado por Sma I
5. Patrones de PM (φ X174 por Hae III + x por Hind III)

Al hidrolizar el DNA plasmídico con la enzima BAP se observa la banda esperada para pGEX en 4.9 kb (figura 2), lo que indica que estos plásmidos se mantuvieron en forma lineal ya que no pudieron ciclizarse por la ausencia del grupo fosfato.

Mediante la purificación por electroforesis preparativa, en gel de agarosa, del DNA de los antígenos 13, 30 y 36, se logró obtener una sola banda para cada caso (2.2 kb, 650 pb y 700 pb respectivamente).

El transformar células de las bacterias HB 101 con los plásmidos preparados anteriormente, permitió el desarrollo de colonias, en medio con ampicilina. De estas colonias, junto con las que contenían el antígeno  $A_4$ , se pudieron identificar aquellas que contenían el antígeno de interés, las cuales fueron crecidas a gran escala en medio LB más ampicilina, induciéndose la proteína de fusión con IPTG 0.1 mM.

Al analizar la electroforesis para la proteína de fusión del antígeno  $A_4$ , (Figura 3) se observa la aparición de una banda (PM 58000), correspondiente a la glutatión transferasa (PM 26000) más la proteína expresada (PM aprox. 32000). Para las proteínas de fusión de los antígenos 30 y 36 (Figuras 4 y 5) las bandas aparecen a la altura de PM aprox de 48000 (correspondiendo la proteína expresada con un PM aprox de 22000 en ambos casos), mientras que para la proteína del antígeno 13 la banda aparece a la altura de PM aprox. 97000 (PM 71000 para proteína expresada) (figura 6). Al analizar los pesos moleculares de estas proteínas se observa que concuerdan con el número de pares de bases de cada uno de dichos antígenos.

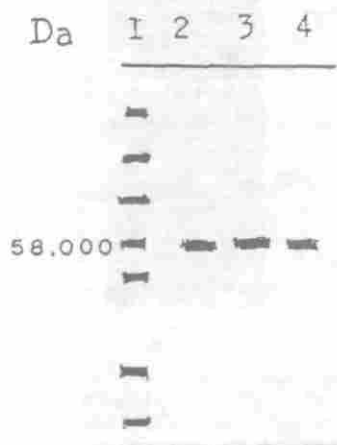


figura 3.

Purificación por cromatografía de afinidad (GSH-agarosa) de la proteína de fusión del antígeno  $A_4$ .

1- patrones de PM  
2- 3.4. Fracciones conteniendo la proteína de fusión.

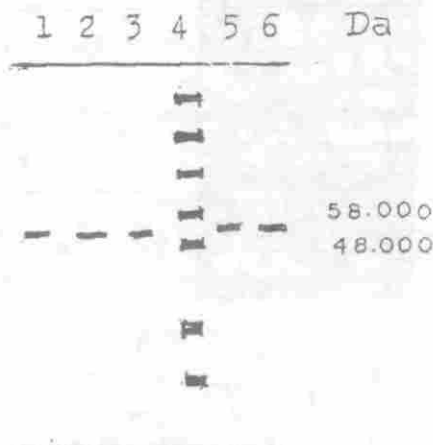


figura 4

Purificación por cromatografía de afinidad (GSH-agarosa) de la proteína de fusión del antígeno 30

1-2-3-5-6. Fracciones conteniendo la proteína de fusión.  
4- Patrones de PM.

Al cuantificar el contenido de proteína expresada para cada antígeno, empleando el método de micro-Bradford, se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla 1.

TABLA 1  
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN EXPRESADAS POR ANTÍGENOS DE  
*Trypanosoma cruzi*

Antígeno	contenido protéico µg/ml	cantidad obtenida mg
13	750	6.0
30	80	0.5
36	82	0.6
A <sub>4</sub>	400	4.0

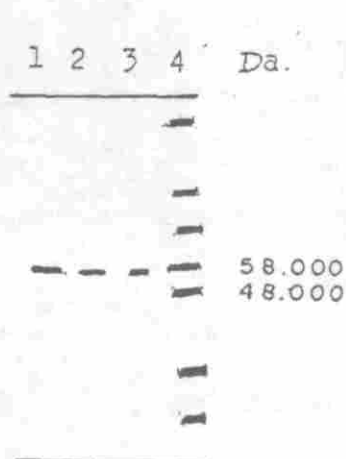


figura 5.

Purificación por cromatografía de afinidad (GSH-agarosa) de la proteína de fusión del antígeno 36

1-2-3. Fracciones conteniendo la proteína de fusión.  
4- patrones PM.

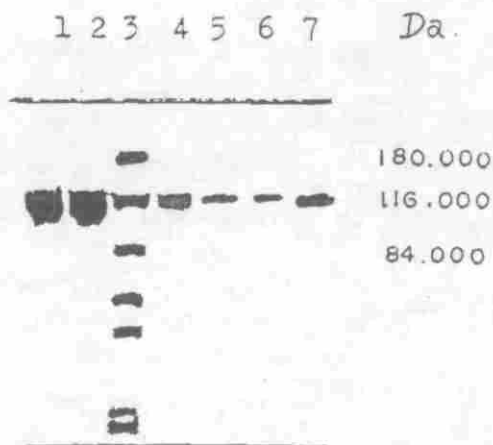


figura 6.

Purificación por cromatografía de afinidad (GSH-agarosa) de la proteína de fusión del antígeno 13

1-2-4-5-6-7. Fracciones conteniendo la proteína de fusión.  
3- Patrones de PM.

Estas proteínas actualmente se utilizan en ensayos inmunológicos de protección en conejos contra el T. cruzi, en laboratorios especializados de Buenos Aires, Argentina.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Programa Internacional de Ciencias Químicas (IPICS) de la Universidad de Uppsala, Suecia; al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia; al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Fundación Campomar de Buenos Aires, Argentina, quienes hicieron posible la realización del presente trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Brener, Z.; *Annu Rev. Microbiol.*, 1973, 27, 347.
2. Ibañez, C.F.; Affranchino, J.L., Fransch, A.C.C.; *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1987, 25, 175.
3. Ali Ouasssi, M., Cornette, J.; Capron, A.; *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1986, 19, 201.
4. Andrews, N.W., Katzin, A.M., Colli, W.; *Eur. J. Biochem.*, 1984, 140, 599.
5. Snary, D., Hudson, L. *FEBS Lett.*, 1979, 100, 166.
6. Nogueira, N., Unkeless, J.; Cohn, Z.; *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1982, 79, 1259.
7. Katziu, A.M., Colli W.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 727, 403.
8. Teixeira, N.M.G., Yoshida, N.; *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1986, 18, 271.
9. Smith D.B., Kevin, S.J. *Gene*, 1988, 67, 31.
10. Sambrook, J., Fritsch, F., Maniatis, T.; *Molecular cloning laboratory manual*, 2° ed., 1989.
11. Ibañez C.F., et.al. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1988, 30, 27.
12. Helfman, D.M., et.al. *Focus* 1984, 6(1), 1.
13. Harlow, Ed., Lane, D., *Antibodies. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.