

Clonaje de la proteína de choque térmico de 20 kDa de *Leishmania amazonensis*

Cloning of 20 kDa heat shock protein of *Leishmania amazonensis*

Ana Margarita Montalvo Álvarez^I; Cristina Folgueira Fernández^{II}; José María Requena Rolanía^{III}

^I Licenciada en Biología. Investigadora Auxiliar. Profesora Auxiliar. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias. Investigadora.. Laboratorio de Parasitología. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, España.

^{III} Doctor en Ciencias. Profesor. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Universidad Autónoma de Madrid, España.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la inducción de las proteínas de choque térmico constituyen un mecanismo homeostático que protege a las células del efecto destructivo del calor u otras condiciones de estrés ambiental, paralelamente, ellas cumplen importantes funciones celulares. La proteína de choque térmico de 20 kDa se reportó recientemente en *Leishmania amazonensis*.

OBJETIVO: describir la metodología utilizada para realizar el clonaje de las proteínas de choque térmico, lo que permitió acometer estudios de algunas propiedades biológicas.

MÉTODOS: la región codificante del gen *hsp20* se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores adecuados. El producto amplificado se clonó inicialmente en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y después en el vector de expresión en procariotas pET-28b (Novagen), para obtener proteína recombinante. De manera paralela, el mismo fragmento se clonó en el vector de expresión en eucariotas pcDNA3 (Invitrogen) para obtener un posible preparado vacunal de ADN. Se realizó la secuenciación nucleotídica de los clones obtenidos, con la finalidad de verificar su fidelidad.

RESULTADOS: se obtuvieron plásmidos recombinantes que codifican la HSP20 de *Leishmania*, y permiten la obtención de proteína recombinante y de ADN en forma masiva.

CONCLUSIONES: ambos plásmidos fueron útiles para estudiar algunas de las propiedades biológicas de esta proteína. Este acercamiento puede ser de interés en otros trabajos de esta índole y constituir una guía metodológica.

Palabras clave: proteínas de choque térmico, *Leishmania amazonensis*, clonaje, vector de expresión.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the induction of heat shock proteins is a homeostatic mechanism that protects cells from the deleterious effects of thermal and other environmental stresses. In addition, they have important cell functions. The 20kDa heat shock protein in *Leishmania amazonensis* was recently reported.

OBJECTIVE: to describe the methodology used for cloning of heat shock proteins, which allowed the study of some biological properties.

METHODS: the hsp20 gene coding region was amplified by polymerase chain reaction using adequate primers. The amplified product was initially cloned in pCR2.1 vector (Invitrogen) and then in pET-28b vector (Novagen), to obtain recombinant protein. The same fragment was cloned also in the eukariote expression vector pcDNA3 (Invitrogen). The nucleotidic sequencing of the different clones was made, in order to verify their fidelity.

RESULTS: the recombinant plasmids that encode HSP20 protein in *Leishmania* and allow obtaining massively recombinant protein and DNA were produced.

CONCLUSIONS: both plasmids were useful to study some of the biological properties of this protein. This approach could be useful for similar research and represent a suitable methodological guideline.

Key words: heat shock proteins, *Leishmania amazonensis*, cloning, expression vector.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por protozoos parásitos del género *Leishmania* y se caracteriza por una variedad clínica y epidemiológica en relación con las especies involucradas en la infección, los vectores transmisores, así como factores ligados al hospedero.¹

Leishmania se transmite por la picadura de insectos de los géneros *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) y *Phlebotomus* (Viejo Mundo). Aproximadamente, 30 especies o subespecies de estos géneros son vectores comprobados, y más de 40 especies adicionales pudieran estar involucradas en la transmisión.² De otra parte, se ha especulado que como los mamíferos de varios órdenes pueden infectarse con la misma especie de *Leishmania* (marsupiales, roedores, edentados y carnívoros), la presión selectiva que ejercen los vectores sobre el parásito debe ser mayor que la ejercida por los hospederos.³

Esto tiene gran importancia, porque durante su ciclo de vida, el parásito se somete a un drástico cambio en la temperatura, desde la temperatura ambiente en el insecto vector hasta las altas temperaturas que encuentra en su hospedero mamífero, y viceversa. La respuesta a este choque térmico, mediada por las proteínas de choque térmico (en inglés *heat shock proteins* [HSPs]) es un

mecanismo homeostático que protege a las células del efecto destructivo del calor u otras condiciones de estrés ambiental.⁴ Por estas razones, se considera que las HSPs deben desempeñar un papel fundamental en la interacción hospedero-parásito.

El objetivo de este trabajo consistió en describir la metodología desarrollada para realizar el clonaje del gen que codifica para la proteína de choque térmico de 20 kDa (HSP20) de *L. amazonensis* en distintos vectores de expresión, lo cual facilitó el estudio de algunas de sus características biológicas.

MÉTODOS

Cepa utilizada

Se utilizó la cepa de *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/pH-8, cedida por el Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España, al Laboratorio de Parasitología del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Los promastigotes se mantuvieron a 26 °C en medio RPMI (Sigma, EE. UU.), suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor, estreptomycin 0,1 mg/mL y 100 U/mL de penicilina.

La estrategia seguida para realizar el clonaje se muestra en la [figura 1](#).

Obtención de ADN genómico

Se siguió el método descrito por *Requena* y otros⁵ con algunas modificaciones. Tras centrifugar a 1 500 *g*, 10⁸ promastigotes se resuspendieron en 0,5 mL de una solución de NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 M, SDS 0,5 % (p/v) y proteinasa K 0,1 mg/mL; se incubó 30 min a 50 °C. El ADN se extrajo sucesivamente con fenol (1 volumen), fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Posteriormente, el ADN se precipitó en presencia de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 7,0 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. El sedimento se resuspendió en 200 µL de tampón Te (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,1 mM pH 8) con RNAsa A a una concentración de 20 µg/mL, y se incubó la muestra a 37 °C durante 30 min. El ADN se purificó mediante precipitación con 0,5 volúmenes de acetato amónico 7,5 M y 2 volúmenes de etanol.

La cantidad y pureza del ADN extraído fue medida en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EE. UU.).

Cebadores

El diseño de los cebadores se realizó a partir de la secuencia del gen *hsp20* de *L. major* depositada en el sitio genedb.org (LmjF29.2450). Para dirigir el clonaje en el vector pcDNA3 (Invitrogen), se incluyó la diana *HindIII* en el cebador directo y *BamHI* en el reverso (subrayado); quedó de la forma siguiente:

Directo: HSP20d 5'- CCAAGCTTAT GTGGAGCCCG AGCAACAA -3'

Reverso: HSP20r 5'- CGGGATCCTT AGTCGATGGT GACTGAGT -3'

Los cebadores fueron suministrados por Isogen (Amsterdam, Holanda).

Reacción en cadena de la polimerasa (hsp20/PCR)

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con el fin de amplificar la región codificante del gen *hsp20* de la citada cepa de *Leishmania*. La mezcla de reacción contenía: cebadores (1 μ M de cada uno); dNTPs (0,2 mM); tampón de la Taq Polimerasa 1 \times ; dimetilsulfóxido (DMSO) 5 %; 2,5 UI AmpliTaq Polimerasa (Applied Biosystems, EE. UU.) y se ensayaron concentraciones variables de MgCl₂ (1,5; 3 y 6 mM). Como molde se empleó ADN genómico (35 y 150 ng) de *L. amazonensis*. El programa utilizado consistió en:

- Paso 1: 94 °C x 5 min

- Paso 2: 30 ciclos de 92 °C x 1 min

65 °C x 1 min

72 °C x 1 min

- Paso 3: 72 °C x 5 min

El protocolo se llevó a cabo en un termociclador MJ Research (Baltimore, EE. UU.). Los productos amplificados (5 μ L) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % en tampón Tris-borato-EDTA (TBE 0,5 \times) (Tris borato 0,45 M, EDTA 0,01 M) y bromuro de etidio (0,5 mg/mL), corriendo a 120 V, por 30 min. La visualización se realizó en un transiluminador UV.

Metodología para el clonaje

Etapa I

Clonaje en el vector pCR2.1: para obtener clones pCRHSP20-La, que contendrían el inserto amplificado mediante la PCR/*hsp20*, el producto amplificado se purificó previamente a partir del gel de agarosa mediante el *gel extraction kit* (Qiagen, EE. UU.) y se clonó en el vector pCR2.1 utilizando el *TA cloning kit* (Invitrogen, EE. UU.) según indica el fabricante. Posteriormente, se realizó la transformación en células XL1-Blue competentes, por medio de choque térmico a 42 °C. Entre los transformantes obtenidos se crecieron varias colonias y se purificó el ADN por medio del juego JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (GENOMED, Dinamarca). Para comprobar el clonaje, el ADN se digirió con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (Boehringer-Mannheim, Alemania) en las condiciones adecuadas. El producto de la digestión se observó en corrida electroforética en gel de agarosa 1,2 %, que corrió a voltaje constante (100 V, por 45 min), con la finalidad de verificar si los transformantes digeridos contenían insertos cuya talla correspondiera con la esperada.

Etapa II

Clonaje en el vector definitivo pET-28b: para obtener clones pETHSP20-La, que permiten la obtención de proteína recombinante mediante su expresión en *Escherichia coli*, se realizó una doble digestión del clon pCRHSP20-La con las enzimas *HindIII*-*NotI* y el fragmento obtenido, correspondiente a la región codificante completa del gen *hsp20* de *L. amazonensis*, fue clonado en los mismos sitios del vector pET28b (Novagen). Para la reacción de ligazón se empleó el *Ligate*

IT™ Rapid Ligation Kit (GE Healthcare, España). Inicialmente, la mezcla se transformó en la cepa XL-1Blue, para comprobar el clonaje mediante patrón de restricción y secuenciación, y después, el ADN se transformó en la cepa de *E. coli* BL21, para poder expresar la proteína.

Clonaje en el vector definitivo pcDNA3: la obtención de clones pcDNA3-LaHSP20 permite su expresión en células eucariotas y con ello la posibilidad de su uso para el desarrollo de un preparado vacunal de ADN. Para ello se digirió el clon pCRHSP20-La con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. El fragmento obtenido, correspondiente a la región codificante completa del gen de interés, se clonó en los mismos sitios del vector pcDNA3. Para la transformación de los productos ligados se utilizó nuevamente el choque térmico en células XL1-Blue competentes, con el fin de obtener clones definitivos pcDNA3-LaHSP20. De los transformantes obtenidos se obtuvo el ADN según condiciones ya descritas (JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (GENOMED), el cual se digirió de nuevo con *HindIII* y *BamHI*, con el objetivo de comprobar si contenían insertos. Para ello, el producto de la digestión se corrió en electroforesis en gel de agarosa en las condiciones ya descritas.

Secuenciación: para verificar la autenticidad del clonaje, las secuencias nucleotídicas de los clones PCRHsp20-La, pET28Hsp20-La y pcDNA3-LaHSP20, se secuenciaron en los momentos adecuados mediante el sistema ABI PRISM BigDye *Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer, EE. UU.). La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuencias, Parque Científico de Madrid, UAM.

RESULTADOS

El análisis informático realizado previamente (<http://www.genedb.org/>) mostró gran concordancia entre las secuencias teóricas de genes codificantes para *hsp20* reportados para el genoma de *L. major* (LmjF29.2450) y *L. infantum* (LinJ29.2810), por lo que se tomó como base la secuencia de *L. major* para realizar el diseño de los cebadores con las características requeridas, tanto en su dimensión, contenido de citosina-guanina (CG), como en los sitios de corte necesarios para las enzimas de restricción.

En relación con el ADN genómico obtenido de los parásitos en cultivo, resultó en una concentración y calidad adecuadas para ser utilizado como ADN molde en la reacción de amplificación mediante RCP, donde se amplificó el gen deseado en todas las condiciones ensayadas, se seleccionó la banda que mayor nitidez y concentración mostró para continuar la estrategia diseñada ([Fig. 2](#)).

Al evaluar el clonaje en el vector pCR2.1 (Etapa I), la corrida electroforética mostró que los clones contenían insertos de la talla esperada, lo que pudo comprobarse luego de la digestión con las enzimas correspondientes ([Fig. 3](#)).

La obtención del gen que codifica para *hsp20*, extraído de estos clones, permitió continuar el proceso hacia la etapa II, clonando en los vectores pET28b y pcDNA3 ([Fig. 4](#)), que fueron digeridos según el caso.

La digestión enzimática posterior permitió en este momento del proceso, comprobar que los insertos tenían la talla aproximada esperada (466 pb), aspecto que se corroboró más tarde al realizar la secuenciación de todos los nucleótidos.

La secuenciación, realizada en el momento indicado para cada objetivo, demostró que no hubo cambios ni sustituciones en las secuencias nucleotídicas de los diferentes clones de la Hsp20, lo que demostró la fidelidad de los procesos realizados para cada caso y la obtención de los transformantes esperados. Esto posibilitó reportar a la base de datos internacional de secuencias de ADN la secuencia de nucleótidos de la nueva proteína obtenida (EMBL número de acceso AM712297), codificada por el gen de la *hsp20* en *Leishmania amazonensis*, lo que resultó el primer reporte de esta proteína en ese género de protozoos.

Los productos obtenidos resultaron útiles para el estudio posterior de propiedades biológicas de la proteína, por lo que el procedimiento general de clonaje realizado resultó adecuado para cumplir los objetivos propuestos.

DISCUSIÓN

En los últimos años, diversos grupos científicos han contribuido a la identificación y caracterización de proteínas en múltiples especies de *Leishmania*, con la realización de procesos de clonaje. En la mayoría de los casos, los objetivos principales han incluido la búsqueda de candidatos vacunales, la identificación de nuevos blancos terapéuticos, o el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas;⁶⁻⁸ cuestiones todas asociadas a los principales problemas que aún presenta esta parasitosis.

Por otra parte, se conoce que la exposición de cualquier tipo de célula u organismo a una variedad de estímulos, resulta en la síntesis incrementada de una familia de proteínas conocidas como proteínas de estrés o choque térmico. Aunque todas tienen un papel fundamental en la termotolerancia, no se puede desconocer su participación en funciones bioquímicas fundamentales, aun en ausencia de estrés celular.⁶ Así, las HSPs se han identificado como inmunógenos fundamentales en algunas enfermedades infecciosas y autoinmunes.^{9,10}

Un estudio reciente demostró el alto nivel de reconocimiento que tienen las HSPs por el sistema inmunitario humano,¹¹ 49 % de los clones productores de proteínas se corresponde a secuencias codificantes de las familias de HSP70, 83 kDa y 90 kDa. Sin embargo, entre las proteínas de choque térmico, existe un grupo de pequeñas proteínas (sHSPs), de las cuales existen pocos reportes acerca de su papel como antígenos durante enfermedades infecciosas.^{12,13} Ello se debe en lo fundamental a que son muy divergentes tanto en talla como en secuencia primaria, y esta característica ha dificultado la caracterización de los genes que las codifican en muchos patógenos y, por tanto, ha limitado el estudio de su posible antigenicidad.¹⁴

Hasta muy reciente, en que nuestro grupo reportó por primera vez esta proteína para *Leishmania*, no existían publicaciones que relacionaron a esta familia de sHSPs como antígenos durante las infecciones por este parásito.¹⁴ El clonaje que se describe en este trabajo permitió demostrar su existencia en esta especie de protozoo y, paralelamente, facilitó el estudio de sus características biológicas.

La proteína recombinante obtenida por causa de la expresión de los clones pETHSP20-La permitió el estudio de sueros humanos y de perros infectados, por medio de un sistema inmunoenzimático (ELISA), lo que posibilitó sugerir la posible utilidad de la rHSP20 para el serodiagnóstico en la leishmaniasis canina.¹⁴

En *Babesia bovis* la HSP20 se reconoció como un antígeno inmunoestimulador que induce linfoproliferación y produce IFN γ .¹⁵⁻¹⁷ En cambio, en *Toxoplasma gondii* esta proteína parece estar relacionada con el antígeno HSP30/bag1, expresado de manera selectiva por los bradizoítos¹⁸ y que resulta protector contra el reto en ratones,¹⁹ lo que apunta a la diversidad de funciones que pudiera cumplir.

Teniendo esto en cuenta, el clonaje en el vector pcDNA3 permitió realizar la inmunización con ADN-HSP20 en el modelo experimental ratón, de lo cual se concluyó que esta proteína no constituye un elemento protector contra el reto infectivo con parásitos de *Leishmania*,¹⁴ al menos en las condiciones investigadas.

En conclusión, la estrategia seguida para clonar el gen que codifica la proteína de choque térmico de 20 kDa de *Leishmania amazonensis* fue satisfactoria y permitió realizar importantes análisis de sus propiedades biológicas. Paralelamente, este proceso puede constituir en términos metodológicos, una guía en futuros estudios de esta índole.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2000;25:363-70.
2. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin Dermatol. 1999;17:279-89.
3. Reithinger R, Dujardin JC, Louzor H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. Lancet. 2007;7:581-96.
4. Lindquist S. The heat shock response. Ann Rev Biochem. 1986;55:1151-91.
5. Requena JM, López MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C. A head-to-tail organization of *HSP70* genes in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res. 1988;16:1393-406.
6. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol Today. 2000;16:246-50.
7. Kubar J, Fragaki K. Recombinant DNA-derived *Leishmania* proteins: from the laboratory to the field. Lancet Infect Dis. 2005;5:107-14.
8. Handman E. Leishmaniasis: Current status of vaccines development. Clin Microbiol Rev. 2001;14:229-43.
9. Young D.B. Heat shock proteins: immunity and autoimmunity. Curr Opin Immunol. 1992;4:396-400.
10. Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. J Clin Invest. 1995;95:3-12.
11. Martins DRA, Jeronimo SMB, Donelson JE, Wilson ME. *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. Infect Immunity. 2006;74:6940-8.

12. Norimine J, Mosqueda J, Palmer GH, Lewin A, Brown WC. Conservation of *Babesia bovis* small heat shock proteins (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes. *Infect Immun*. 2004;72:1096-106.
13. Ferrer E, González LM, Foster-Cuevas M. *Taenia solium*: characterization of a small heat shock protein (Tsol-sHSP35.6) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. *Exp Parasitol*. 2005;110:1-11.
14. Montalvo-Álvarez AM, Folgueira C, Carrión J, Monzote-Fidalgo L, Cañavate C, Requena JM. The Leishmania HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental *L. amazonensis* infection. *J Biomed Biotechnol* [serial on the Internet]. 2008[cited 2008Jan 8];695432:[about 9 p.]. Available in: <http://www.hindawi.com/GetArticle.aspx?doi=10.1155/2008/695432>
15. Brown WC, Logan KS, Zhao S, Bergman DK, Rice-Ficht AC. Identification of *Babesia bovis* merozoite antigens separated by continuous flow electrophoresis that stimulate proliferation of helper T cell clones derived from *B. bovis*-immune cattle. *Infect Immun* 1999;63:106-16.
16. Brown W.C.; Ruef B.J.; Norimine J.; Kegerreis K.A.; Suarez C.E.; Conley P.G. et al .A novel 20-kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina* stimulates memory CD4⁺ T lymphocyte responses in *B bovis*-immune cattle. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;119:236-44.
17. Stich RW, Rice-Ficht AC, Brown WC. *Babesia bovis*: common protein fractions recognized by oligoclonal *B.bovis*-specific CD4⁺ T cell lines from genetically diverse cattle. *Exp Parasitol*. 1999;91:40-51.
18. Bohne W, Gross U, Ferguson DJP, Heesemann J. Cloning and characterization of a bradizoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol*. 1995;16:1221-30.
19. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, Mun HS, Norose K, Belal US et al. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30, and SAG1 genes. *Vaccine*. 2003;21:2852-61.

Recibido: 18 de noviembre de 2008.

Aprobado: 11 de marzo de 2009.

Lic. Ana Margarita Montalvo Álvarez. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correos electrónicos: amontalvo@ipk.sld.cu; cfolgueira@cbm.uam.es; jmrequena@cbm.uam.es

