

## Clonación y expresión recombinante del factor de elongación-1 $\alpha$ de *Leishmania infantum*

Kenia López-López, Alejandra López-Arredondo, Israel Castro-García, Cristina Olivas-Bejarano, Evangelina Beltrán-López, Héctor Samuel López-Moreno\*

Laboratorio de Biomedicina Molecular, CAC-UAS 264, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.

### ABSTRACT

#### Cloning and recombinant expression of elongation factor-1 $\alpha$ of *Leishmania infantum*

**Introduction.** In visceral leishmaniasis (VL), in old world caused by *Leishmania donovani*, elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) is an antigen-activator of SHP-1 phosphatase that inhibits the leishmanicidal activity of macrophages. However, the relevance of EF-1 $\alpha$  from *L. infantum* in VL of the new world is still unknown.

**Objective.** Obtain the recombinant protein of EF-1 $\alpha$  from *L. infantum* (rEFLi).

**Material and methods.** The *EFLi* gene was cloned, sequenced, and expressed as recombinant protein in a prokaryotic system. rEFLi was purified and its immunogenicity was verified.

**Results.** The *EFLi* gene has 1350 pb, with 25 nucleotide differences, 10 amino acid differences and without structural differences (3D) compared to EFLd. rEFLi (50 kDa), was recognized by sera from mice immunized with its homologous genetic construction.

**Conclusion.** Our evidence suggests that rEFLi can be evaluated as a biotechnological vaccine alone or in combination, for the prevention of VL.

#### RESUMEN

**Introducción.** En la leishmaniasis visceral (LV), del viejo mundo causada por *Leishmania donovani*, el factor de elongación-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), es un antígeno-activador de la fosfatasa SHP-1 que inhibe la actividad leishmanicida de macrófagos. Sin embargo, la relevancia del EF-1 $\alpha$  de *L. infantum* en la LV del nuevo mundo aún es desconocida.

#### Historial del artículo

Recibido: 31 ene 2022

Aceptado: 6 jun 2022

Disponible en línea: 1 ene 2023

#### Palabras clave

Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, factor de elongación-1 $\alpha$ , proteína recombinante.

#### Keywords

Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, elongation factor-1 $\alpha$ , recombinant protein.

Copyright © 2023 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

\*Autor para correspondencia:

Dr. Héctor Samuel López-Moreno, Escuela de Medicina, Universidad Anáhuac Mayab Carretera Mérida Progreso Km. 15.5 AP. 96 Cordemex, C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México. Tel. (999)9424800 Ext. 679. Cel. (999)3386667

E.mail: [hslmoreno@me.com](mailto:hslmoreno@me.com)

<https://revistabiomedica.mx>.

**Objetivo.** Obtener la proteína recombinante del EF-1 $\alpha$  de *L. infantum* (rEFLi).

**Material y métodos.** Se clonó, secuenció y expresó como proteína recombinante el gen *EFLi* en un sistema procarionte. rEFLi fue purificada y se verificó su inmunogenicidad.

**Resultados.** El gen *EF-Li* posee 1350 pb, con 25 diferencias nucleotídicas, 10 diferencias aminoácidas y sin diferencias estructurales (3D), en comparación con EFLd. rEFLi (50kDa) fue reconocida en sueros de ratones inmunizados por su construcción genética homóloga.

**Conclusión.** Nuestras evidencias sugieren que rEFLi puede evaluarse como vacuna biotecnológica sola o en combinación, para la prevención de la LV.

## INTRODUCCIÓN

*Leishmania infantum* (*L. infantum*) es un protozoo parásito intracelular causante de la leishmaniasis visceral en América (1), representa la forma clínica más severa y la segunda causa de muerte por parásitos, sólo después de la malaria (2). *L. infantum* es transmitida a los seres humanos por la picadura de dípteros hembras hematófagas del género *Lutzomyia* (3). En México, *L. infantum* es la especie que causa la LV, por lo que el estudio de la inmunobiología de la relación hospedero-parásito es de gran relevancia para establecer las bases celulares y moleculares que contribuyan a su prevención y control. En la búsqueda de antígenos inmunodominantes de *Leishmania* que pudieran ser de gran trascendencia para este fin, destaca el factor de elongación-1 $\alpha$  el cual ha sido descrito en *L. donovani*, especie que causa la LV en el Viejo Mundo, como una proteína antigénica con función dual: una canónica descrita en células eucariotas involucrada en la síntesis de proteínas y la otra, no-canónica como activador de la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (fosfatasa de células hematopoyéticas que posee un dominio SH2) e inhibidor de la actividad leishmanicida de los macrófagos (4). Sin embargo, la relevancia del EF-1 $\alpha$  de *L. infantum* en la inmunobiología de la LV aún se desconoce. Para iniciar con ese estudio, un aspecto clave es la obtención de la proteína recombinante utilizando un sistema de expresión procarionte con un riesgo reducido para el personal que la produzca y asegurar disponer de grandes cantidades de ésta,

aunado a ello se aprovecha de la experiencia en la clonación y expresión recombinante del EF-1 $\alpha$  de *L. mexicana* (5).

## MATERIAL Y MÉTODOS

A partir del cultivo de la cepa de *L. infantum* ATCC 50134 en medio RPMI-10 (RPMI-1640, gentamicina 100mg y 10% de suero fetal bovino, todos de Gibco), se llevó a cabo la extracción de DNA genómico (gDNA), empleando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN). El gDNA obtenido se utilizó como templado para estandarizar las condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), necesarias para amplificar el gen *EF-1a* de *L. infantum*, se emplearon los iniciadores específicos previamente diseñados *in silico* utilizando el programa Oligo versión 7 y el gen correspondiente al *EF-1a* en el genoma de referencia de *L. infantum* JPCM5 (GenBank: XM\_003392352.1). Sitios diana de enzimas de restricción fueron agregados a cada iniciador para asegurar la correcta orientación del producto de PCR, se sintetizaron como: EFLi-F (conteniendo la diana de la enzima BamHI) y EFLi-R (conteniendo la diana para la enzima AgeI). El producto de PCR obtenido fue aislado y purificado a partir de un gel de agarosa al 1% empleando el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel). La identidad del producto obtenido fue confirmada por secuenciación en la unidad de servicio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El gen *EF-1a* modificado fue digerido con las enzimas de restricción usadas en la mutagénesis dirigida (descritas anteriormente) y fue ligado en el plásmido pcDNA6-myc A, donado gentilmente por el Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete del CINVESTAV-Zacatenco. El DNA recombinante (rDNA) fue amplificado en cultivos de *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa MACH-1-T1 en medio SOB (*Super Optimal Broth*), el rDNA aislado por miniprep (siguiendo protocolos estándar) fue insertado en células competentes de *E. coli* cepa BL-21. Las transformantes verificadas mediante “*Colony-PCR*” como poseedoras de nuestra proteína recombinante (denominada como rEFLi, a

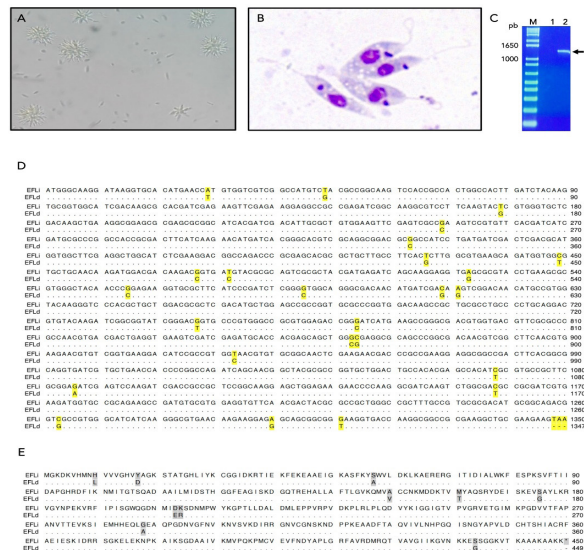
partir de aquí), fueron cultivadas en un l de medio SOC (*Super Optimal Broth* o SOB con 20mM de glucosa), adicionado con 100 $\mu$ g/ml de ampicilina (Gibco), y se incubaron en agitación orbital a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar la densidad óptica (DO), de 0.6 para inducir la expresión de rEFLi con 1mM de IPTG (Gibco), durante 6h. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5000 rpm durante 10min, los cuerpos de inclusión se aislaron y solubilizaron siguiendo el protocolo descrito por López-López *et al*, 2018 (5). rEFLi fue purificado por cromatografía de afinidad a níquel (Ni), utilizando una columna *HiTrap Chelating* (GE), siguiendo el protocolo descrito por López-Moreno *et al*, 2003 (6). Ratonas hembra de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad fueron inmunizadas con 2 dosis de 100mg de la construcción genética de rEFLi (descrita arriba), disuelta en PBS (amortiguador salino de fosfatos pH 7.2), vía subcutánea con intervalo de diez días entre dosis, los sueros fueron colectados 7 días después de la 2a dosis y almacenados a -80 °C hasta su uso (6). La identidad inmunoquímica de rEFLi fue verificada mediante *Western blot*, siguiendo protocolos estándar con base en lo descrito por López-López *et al*, 2018 (5). Las estructuras 3D fueron predichas en el portal Phyre 2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>), y analizadas en el *software* de acceso libre Chimera 1.16.

**RESULTADOS**

La morfología típica del promastigote fue observada mediante micrografías correspondientes al cultivo de *L. infantum* ATCC 50134, tanto en medio RPMI-10 (Figura 1A), como teñida con Giemsa (Figura 1B). El producto de la PCR mostró un tamaño molecular de aproximadamente 1370pb en el gel de agarosa 2% p/v (Figura 1C), de los cuales 1350 corresponden al gen *EF-1 $\alpha$*  de *L. infantum* completo (registrado en el GenBank con número de acceso: KP826834) y el resto a la adición de los sitios diana para la correcta inserción en el vector de expresión utilizado. La secuencia génica fue comparada con la secuencia del *EF-1 $\alpha$*  de *L. donovani* (*EFLd*) (Figura 1D), donde se observan 25 diferencias nucleotídicas (resaltadas en

amarillo), en tanto que las diferencias al comparar las estructuras primarias nativas de ambas proteínas solo difieren en 10 residuos (destacadas en color gris) (Figura 1E).

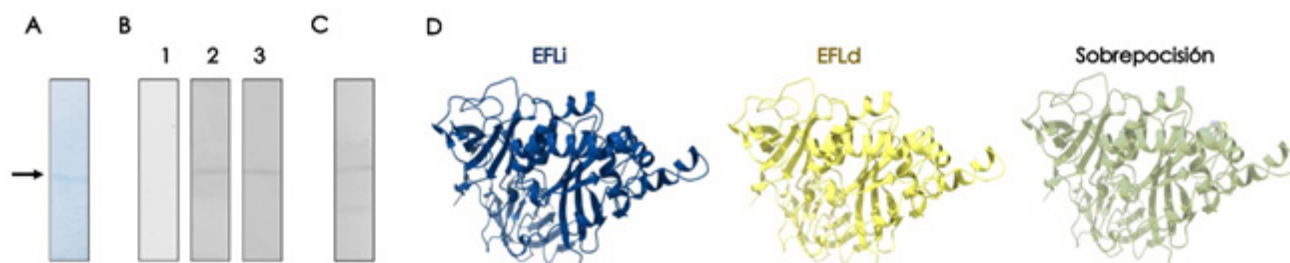
Figura 1



**Figura 1.** Clonación del gen *EF-1 $\alpha$*  de *L. infantum*. A y B) Micrografías de promastigotes de *L. infantum*. En cultivo vivo en medio RPMI-10, tomada con el objetivo de 40X en un microscopio invertido Motic y cámara de celular iPhone X (A) o teñidos con Giemsa (B), tomada con objetivo de 100X en un microscopio Leica DM750 triocular acoplado a una cámara Leica EC3 y zoom óptico de 3X, obtenidas empleando el *software* Leica Application Suite versión 1.8.0, con amplificación combinada de 300X. C) Carril M: marcador molecular de 1Kb Plus (Invitrogen). Carril 1: control negativo de reacción usando DNA irrelevante de *Salmonella typhimurium* cepa 14028 (ATCC). Carril 2: Producto de PCR de 1350pb (indicada con la flecha negra) correspondiente al gen *EF-1 $\alpha$*  de *L. infantum* (GenBank: KP826834), visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v teñido con SybrGold (Invitrogen). D) Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del *EF-1 $\alpha$*  de *L. donovani* (EFLd) y *L. infantum* (EFLi). Los nucleótidos idénticos (98.15%), se muestran con puntos y los diferentes con fondo amarillo. E) Comparación de las secuencias de aminoácidos de EFLi y EFLd. Los aminoácidos idénticos (97.77%), se muestran con puntos y los distintos con fondo gris.

En la figura 2A, se observa una banda de aproximadamente 50kDa correspondiente a la proteína rEFLi purificada (señalada con una flecha negra), la cual pudo ser detectada por anticuerpos específicos generados mediante la inmunización de ratones BALB/c con la construcción genética de rEFLi, tanto en su forma purificada como en un extracto proteico obtenido del lisado de promastigotes de *L. infantum* (Figura 2B). Asimismo,

los anticuerpos anti-rEFLi fueron capaces de reconocer a la proteína homóloga de *L. mexicana* denominada rEFLm (Figura 2C) (5), confirmando la identidad inmunoquímica de EFLi. Al comparar las estructuras tridimensionales de EFLi y EFLd, empleando los *softwares* de predicción y modelado (3D), no se detectaron diferencias observables entre ellas (Figura 2D).



**Figura 2.** Expresión recombinante de EFLi (rEFLi). A) rEFLi purificado (50kDa), señalado con la flecha negra. B) Western blot empleado como antígeno rEFLi (Tiras 1 y 2) y un extracto proteico de promastigotes de *L. infantum* (Tira 3). La tira 1 fue incubada con el suero pre-inmune de ratón. Tiras 2 y 3: inmunodetección con un suero de ratón inmunizado con la construcción genética de rEFLi y revelado con anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Bio-Rad); resultado representativo de 2 experimentos independientes. C) Western blot usando rEFLm como antígeno y anticuerpos anti-rEFLi empleando un suero de un ratón inmunizado con la construcción genética de rEFLi, resultado representativo de 2 experimentos independientes. Todos los sueros se emplearon a una dilución 1:100. D) Modelado estructural 3D de las proteínas EFLi (azul) y EFLd (amarilla) y su superposición (verde), sin observar diferencias estructurales.

## DISCUSIÓN

El tamaño del gen *EFLi* completo es idéntico al de *EFLd* y al de *L. mexicana* (*EFLm*) (5). Las diferencias menores (10 residuos), entre las estructuras primarias de EFLi y EFLd no repercuten en la estructura tridimensional de ambas proteínas, como observó previamente nuestro equipo de investigación, entre la proteína homóloga de *L. mexicana* (*EFLm*), y EFLd (5). La superposición 3D de ambas proteínas sugiere que EFLi también es capaz de desarrollar la función no-canónica de activar a la fosfatasa SHP-1 como se reportó para EFLd (4). Sin embargo, es necesario verificar dicha hipótesis. La inexistencia de exones en el gen *EFLi* codificante facilitó el empleo de un sistema de expresión recombinante procarionte, lo que adicionalmente ofrece la ventaja de reducir los riesgos sanitarios de una infección accidental de los productores del EFLi al prescindir de la necesidad de cultivar a los promastigotes de

*L. infantum* y ofrece la ventaja biotecnológica de su producción a gran escala, para su estudio en la relación hospedero-*Leishmania*. La capacidad de la construcción recombinante de EFLi de inducir una respuesta humoral antígeno-específica, ofrece la opción de ser evaluada como una estrategia de vacunación genética en modelos preclínicos para la prevención de la LV, ya sea sola en combinación con la rEFLi completa o uno de sus epítopes derivados (7), o bien combinada con otros antígenos inmunodominantes de *Leishmania*, para ello son necesarios estudios adicionales.

## CONCLUSIONES

Se logró la clonación del gen *EFLi*, su verificación por secuenciación (GenBank: KP826834), así como su producción recombinante en un sistema de expresión procarionte que lo posiciona como una herramienta biotecnológica que permite evaluar su



participación en la inmunobiología de la relación hospedero-*Leishmania* en la LV o bien evaluar su potencial como vacuna genética (o recombinante), sola o en combinación con otros antígenos, contra ésta u otras especies de *Leishmania* que afectan a la salud de la población de nuestro país y de otros en el mundo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al CONACYT fondo CB 2014 #240185, así como al fondo PROFAPI-UAS/105 por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Scarpassa VM, Alencar RB. Molecular taxonomy of the two *Leishmania* vectors *Lutzomyia umbratilis* and *Lutzomyia anduzei* (Diptera: Psychodidae) from Brazilian Amazon. *Parasit & Vect.* 2013 6:258. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-258>
2. Alvar J, Croft S, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed S. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine.* 2013 B244-B249. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.080>
3. Matrangolo F, Liarte D, Andrade L, Melo M, Andrade J, Ferreira R, et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol.* 2013 190: 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.006>
4. Nandan D, Lopez M, Ban F, Huang M, Li Y, Reiner N, et al. Indel-Based Targeting of Essential Proteins in Human Pathogens That Have Close Host Orthologue(S): Discovery of Selective Inhibitors for *Leishmania donovani* Elongation Factor-1a. *Wiley Intersci.* 2007 67: 53-64. <https://doi.org/10.1002/prot.21278>
5. López-López K, Apodaca-Medina A, León-Sicairos CR, Murúa-López CC, Ortiz-Navarrete VF, Chávez-Ontiveros J, et al. Cloning and recombinant expression of Elongation Factor-1a of *Leishmania mexicana*. *Vector Borne Zoon Dis.* 2018 18(12): 709-712. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2347>
6. López-Moreno HS, Correa D, Laclette JP and Ortiz-Navarrete VF. Identification of CD4<sup>+</sup> T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite immunol.* 2003 25: 513-516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2003.00658.x>
7. Iborra S, Soto M, Carrión J, Nieto A, Fernández E, Alonso C, et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003 71(11): 6562-6572. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6562-6572.2003>