

COMUNICACIÓN CORTA

Clonaje y expresión heteróloga de un fragmento de la proteína CagA de *Helicobacter pylori*

Lino E. Torres, Ludisleydis Bermúdez, Ana L. López, Orlando Reyes, Javier Campos,* Mayrín Hernández y Boris L. Rodríguez.

Departamentos de Microbiología e Inmunología y *Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: boris.rodriguez@cnic.edu.cu

Recibido: 17 de julio de 2009.

Aceptado: 18 de agosto de 2009.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, CagA, diagnóstico serológico, clonaje, expresión.
Key words: *Helicobacter pylori*, CagA, serologic diagnosis, cloning, expression.

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa, bacilar y espirilada, que infecta a más del 50 % de la población mundial.¹ Es considerado el principal agente etiológico de diversas patologías gástricas como gastritis, úlcera gástrica o duodenal y cáncer gástrico.² Este patógeno fue declarado en 1994, agente carcinogénico de tipo I para el hombre, por la Organización Mundial de la Salud.³

La proteína codificada por el gen A asociado a la citotoxina (CagA) es el principal factor de patogenia de la bacteria y las cepas que la portan son más patógenas y clasificadas como cepas tipo I.⁴ CagA es una proteína de 120-145 kDa, con una región carboxilo-terminal variable y fue secuenciada por primera vez en 1993.^{5,6} Al inicio del descubrimiento de CagA, el marcado interés en esta proteína se debió a su inmunodominancia en pruebas serológicas, pese a que se expresa en bajas concentraciones en *H. pylori*.^{5,6} Aproximadamente el 60 % de las cepas de *H. pylori* son *cagA* positivas y su presencia se ha correlacionado con la aparición de patologías gástricas más severas.^{4,7} La toxina CagA altera numerosas señales en las células del epitelio gástrico, lo que influye en la patogénesis promovida por la infección con *H. pylori*.^{4,7} Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo fue obtener un fragmento recombinante de CagA, para evaluar la seropositividad a esta toxina en pacientes con trastornos gastroduodenales.

El fragmento a clonar se escogió porque su secuencia aminoacídica estaba incluida en los fragmentos descritos en la literatura y además, contenía motivos aminoacídicos que son inmunogénicos.^{5,6} El ácido desoxirribonucleico (ADN) de la cepa de *H. pylori* Hp14 fue empleado como molde para amplificar el fragmento del gen *cagA*, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos para la amplificación se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Ciudad de La Habana) con las secuencias siguientes: oligonucleótido de *cagA* directo (5'-AGACTCGAGTA-AATCTTTTGATGAAT-3', oligonucleótido de *cagA* reverso (5'-ATCTCTGCGAG TTGTCTATCGTTTACTCTA GGTT-3').

Los oligonucleótidos se diseñaron basados en la secuencia del gen de la cepa de *H. pylori* 26695, que está disponible en la base de datos del Genbank. El fragmento del gen *cagA* amplificado codifica para el polipéptido comprendido entre los aminoácidos lisina 704 y glutamina 1027 y con una talla aproximada de 39 kDa.

Las reacciones se llevaron a cabo de la manera siguiente: una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante un minuto, seguida de 40 ciclos que constaron de otra etapa de desnaturalización a la misma temperatura durante un minuto; un minuto de hibridación a 61 °C; una etapa de extensión a 72 °C durante dos minutos y una final de extensión a 72 °C durante cinco minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo de ciclos térmicos Mastercycler (Eppendorf, Alemania). La purificación del producto de PCR se realizó mediante el juego de reactivos de purificación *GFX™ PCR DNA and gel Band Purification* (Amersham, E.U.A). El ADN plasmídico se purificó con el sistema *Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega, E.U.A) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa según lo descrito por Sambrook *et al.*⁸ El fragmento de ADN amplificado del gen *cagA* de 1 kb se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI* (Promega, E.U.A). El inserto escindido de 1 kb, codificante de un fragmento de la proteína CagA, se ligó al vector de expresión *pBAD/HisB* (Invitrogene, Alemania), digerido con las mismas enzimas. Esta construcción genética lo sitúa cuesta abajo del promotor *pBAD*, que tiene como inductor a la arabinosa. El fragmento recombinante clonado además contiene seis histidinas en el extremo amino terminal e incluye un codón de parada en el extremo 3' correspondiente al oligo reverso.

Para realizar la transformación bacteriana, la cepa de *Escherichia coli* Top 10 se cultivó en 5 mL de caldo LBA,⁸ ajustado a pH 7,5 y se creció en una zaranda orbital con termostato (Newbrunswick, USA) durante toda la noche a 37 °C y 200 r · min⁻¹. La transformación bacteriana se realizó mediante electroporación según lo descrito por

Dower *et al.*⁹ Posteriormente, se chequeó la presencia de clones transformantes y se obtuvieron cuatro. A partir de estos clones, se purificó el ADN plasmídico, como fue descrito anteriormente para la purificación del vector pBAD/HisB. El chequeo de restricción con las enzimas XhoI y PstI produjo fragmentos de talla de 4,1 y 1 kb, lo que evidencia que se extrae la banda esperada, mientras que con la enzima KpnI se obtuvo una sola banda de 5,1 kb, confirmando así una correcta clonación. Este plasmidio con el inserto se denominó pHisB-CagA. La cepa *E. coli* Top 10, transformada con el plásmido de expresión, se usó para expresar el polipéptido de CagA.

Para evaluar la expresión del fragmento recombinante de la proteína CagA, se inocularon los clones seleccionados en 5 mL de caldo LBA y se cultivaron en zaranda en iguales condiciones que el cultivo anterior de la cepa *E. coli* Top 10. La expresión del fragmento del gen *cagA* se indujo a continuación por adición de arabinosa a una concentración de 0,2 % (p/v) e incubación por 4 h adicionales. Para la colección de la biomasa bacteriana se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó cinco min a 12 000 r · min⁻¹. La evaluación de la expresión del fragmento de CagA se realizó por análisis del perfil proteico total de las cepas de *E. coli* Top10 transformadas, mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliácridamida (SDS-PAGE) según Laemmli.¹⁰ El pellet celular se resuspendió en PBS, de forma que la concentración celular fuera equivalente para todas las muestras, se mezcló con igual volumen de disolución reguladora de SDS y se hirvió durante diez minutos. Las muestras se separaron en un gel de acrilamida al 12 %, en presencia de disolución reguladora tris-glicina y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Se aplicó además, un patrón de peso molecular (Promega, USA) para determinar la talla del polipéptido recombinante. Las muestras de los cultivos, antes y después de la adición del inductor de expresión (arabinosa), analizadas por SDS-PAGE, no mostraron ninguna banda de proteína diferencial (Fig. 1, Panel A).

Adicionalmente, se variaron los tiempos de inducción de arabinosa (0,2 %) de 4 a 6, 8 y 16 h respectivamente, con el objetivo de incrementar la expresión del fragmento recombinante. Al igual que en la experimentación anterior, no se evidenció por SDS-PAGE la expresión del fragmento recombinante con ninguna de las variables utilizadas.

Para comprobar por inmunodetección la presencia del fragmento de CagA, se empleó la técnica del Western Blot (W.B.), que se desarrolló según el procedimiento descrito por Towbin *y col.*¹¹ Se utilizaron membranas de nitrocelulosa HybondTM-C (Amersham, Reino Unido). Las membranas se incubaron con un suero que presenta inmunorreacción positiva a la proteína CagA (el suero se diluyó 1 : 100 en disolución estabilizadora de fosfato salino (PBS) con tween-20 al 0,05 %) durante 5 h con agitación y a temperatura ambiente. Luego, las membranas se lavaron y se incubaron durante una hora con un anticuerpo monoclonal específico para la cadena pesada de la IgG humana conjugado a peroxidasa (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana), diluido 1 : 1 000 en PBS con tween-20 0,05 % y leche descremada al 1 %. Finalmente, el revelado se efectuó con una disolución de diaminobenzidina (0,24 %) disuelta en disolución estabilizadora de Tris (20 mmol · L⁻¹, pH 7,6), a la que se añadieron 40 µL de peróxido de hidrógeno 30 %. Todas las imágenes de los geles y las membranas fueron captadas con el equipo de bioimágenes Gene Genius (Syngene, Reino Unido) y procesadas con el programa Gene tools. Los cuatro clones que habían sido seleccionados porque incorporaron el vector con el inserto pHisB-CagA, expresaron el fragmento recombinante de CagA. Esto se evidenció por la presencia de una banda de inmunorreacción en los cultivos inducidos con arabinosa, que coincidió con la talla molecular teórica del fragmento recombinante (39,5 kDa) (Fig. 1, Panel B, Carriles 7-10). En los cultivos sin inducir con arabinosa no se evidenció la inmunorreacción (Fig. 1, Panel B, Carriles 3-6), lo cual ratifica que la banda de 39,5 kDa es el polipéptido codificado por el fragmento del gen *cagA* que fue clonado.

Para evaluar preliminarmente las propiedades de inmunorreacción del péptido recombinante de CagA, se realizó un Western Blot en el que se incubó el extracto celular de uno de los clones con sueros de pacientes dispepticos. Los sueros empleados habían sido clasificados previamente como *cagA* positivos o negativos mediante un WB, que empleó el extracto proteico de una cepa de *H. pylori cagA* positiva.¹² La técnica del WB fue realizada tal y como fue descrita con anterioridad, cuando se realizó la inmunodetección para comprobar la presencia del fragmento de CagA. Todos los sueros clasificados

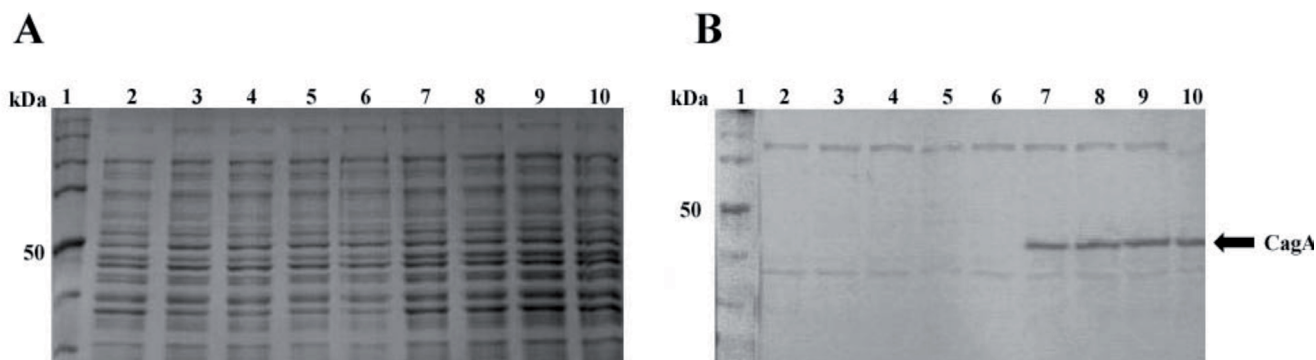


Fig. 1. Gel de SDS-PAGE y membrana de nitrocelulosa de la cepa *E. coli* Top10 sin transformar y transformada con plasmidio pHisB-CagA. Panel A: SDS-PAGE de los extractos proteicos de la cepa de *E. coli* Top10. Carril 1. Patrón de peso molecular (Promega, USA). Carril 2. *E. coli* Top10 sin transformar. Carriles 3-6. Clones transformados con pHisB-CagA sin inducir. Carriles 7-10. Clones transformados con pHisB-CagA inducidos con arabinosa. Panel B: Membrana de nitrocelulosa. Carril 1. Patrón de peso molecular (Promega, USA). Carril 2. Cepa de *E. coli* sin transformar. Carriles 3-6. Clones transformados con pHisB-CagA sin inducir e incubados con un suero positivo a CagA. Carriles 7-10. Clones transformados con pHisB-CagA inducidos con arabinosa e incubados con un suero positivo a CagA.

como seropositivos a CagA presentaron una buena inmunorreacción con el fragmento recombinante (Fig. 2, Panel A). Mientras que con sueros negativos a CagA y sueros negativos a *H. pylori*, no se constató la presencia de la banda de inmunorreacción de 39,5 kDa (Fig. 2, Panel B). Lo cual sugiere que el fragmento clonado de CagA es óptimo para clasificar los sueros como seropositivos o no a esta toxina, lo que debe ratificarse mediante la evaluación de un mayor número de sueros.

Diferentes estudios han reportado la utilidad para el inmunodiagnóstico, de fragmentos de la proteína CagA similares al aquí obtenido.^{5,6} En Cuba, sería de

gran importancia contar con una herramienta para este inmunodiagnóstico, pues un estudio previo detectó una elevada seropositividad a la toxina CagA en pacientes dispépticos cubanos.¹³

CONCLUSIONES

El plasmidio pHisB-CagA es útil para la expresión heteróloga, en *E. coli*, de un fragmento recombinante de la proteína CagA de *H. pylori*, aunque se obtiene con muy bajo rendimiento. El fragmento recombinante de CagA parece tener buenas propiedades para el inmunodiagnóstico, lo cual debe validarse mediante la evaluación de un panel de sueros.

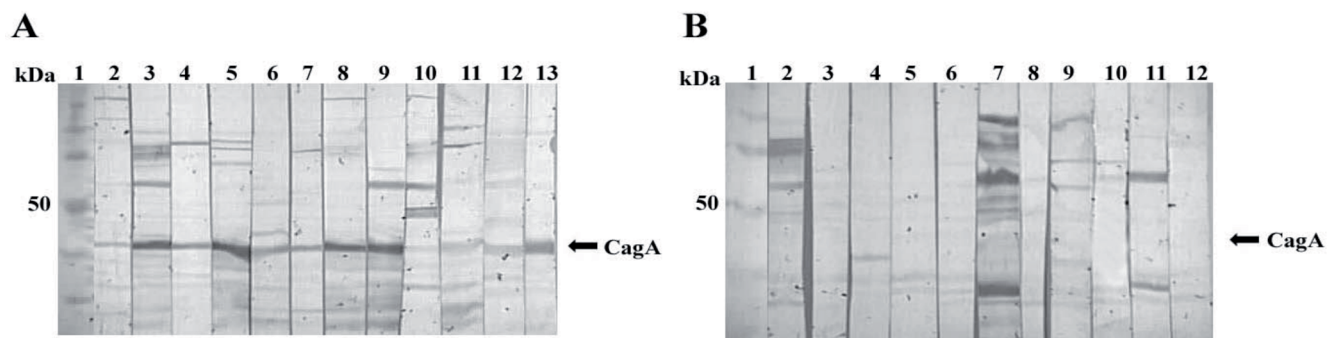


Fig. 2. Membranas de nitrocelulosa del extracto proteico de *E. coli* Top10 transformada con pHisB-CagA e incubadas con sueros de pacientes dispépticos. Panel A: Carril 1. Patrón de peso molecular (Promega, USA), Carriles 2-13. Extracto celular de un clon Top 10 transformado con pHisB-CagA, inducido con arabinosa e incubado con sueros positivos a CagA. Panel B: Carril 1. Patrón de peso molecular (Promega, USA), Carriles 2-12. Clon Top 10 transformado con pHisB-CagA, inducido con arabinosa e incubado con sueros negativos a CagA y negativos a *H. pylori*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja V, Sharma MP. High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology*. 2002;123:653-654.
- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347:1175-1186.
- World Health Organization. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. 1994;61:177-240.
- Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2005; 96:835-843.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G *et al*. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90: 5791-5795.
- Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993;61:1799-1809.
- Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:688-69.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:6127.
- Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76:4350-4354.
- Torres LE, Bermúdez L, Roblejo Y, Moreno A, Samada M, Cansino J *et al*. Desarrollo de un método serológico propio para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* y su comparación con dos juegos comerciales. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2008;39:115-120.
- Valmaseda T, Gisbert JP, Paniagua M, Pajares JM. *Helicobacter pylori* CagA antibodies in various gastroduodenal diseases from 2 different populations. *Med Clin (Barc)*. 2002;118:90-93.