

COMUNICACIÓN CORTA

Transcripción de genes de proteínas de membrana de un aislamiento cubano de *Anaplasma marginale*

Adrian Alberto Díaz Sánchez, Siomara Martínez Marrero, Damaris Relova Vento,
Carmen Laura Perera González, Belkis Corona González*

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, Apartado 10, CP 32700,
San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: adiaz@censa.edu.cu.

RESUMEN: *Anaplasma marginale* es una rickettsia que infecta los eritrocitos maduros del ganado bovino, con alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales. Estudios recientes, con enfoque proteómico y genómico, identificaron más de 20 proteínas inmunogénicas dentro de la porción de membrana externa, además de las proteínas principales de superficie MSP1-MSP5, previamente caracterizadas. El presente trabajo tiene como objetivo verificar que los genes que codifican para las proteínas VirB9-1, VirB9-2, VirB10 y Ef-Tu del aislamiento Habana de *A. marginale* se transcriben durante la infección en el bovino. El ARN se purificó de la sangre de un animal experimentalmente infectado con el aislamiento Habana de *A. marginale*. Después de la transcripción reversa, los genes *virB9-1*, *virB9-2*, *virB10* y *EF-Tu* se amplificaron por PCR y se detectaron transcritos de todos los genes analizados.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, VirB9-1, VirB9-2, VirB10, Ef-Tu.

Transcription of genes of membrane proteins of a Cuban isolate of *Anaplasma marginale*

ABSTRACT: *Anaplasma marginale* is a vector-borne rickettsia with high incidence in tropical and subtropical regions that infects the mature erythrocytes of ruminants. Recent studies with proteomic and genomic approaches have identified more than 20 immunogenic proteins within the outer membrane portion, in addition to the major surface proteins MSP1-MSP5 previously characterized. The aim of this study was to verify that the genes encoding for the proteins VirB9-1, VirB9-2, VirB10 and Ef-Tu of *A. marginale* Habana strain are transcribed during infection in cattle. The RNA was purified from blood of an experimentally infected animal with *A. marginale* Habana strain. After reverse transcription, *virB9-1*, *virB9-2*, *virB10* and *EF-Tu* genes were amplified by PCR and transcripts of all genes analyzed were detected.

Key words: *Anaplasma marginale*, VirB9-1, VirB9-2, VirB10, Ef-Tu.

Anaplasma marginale es un parásito intracelular obligado perteneciente al orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, que invade los eritrocitos maduros del ganado bovino (1). Esta rickettsia es el patógeno que se transmite por garrapatas con mayor prevalencia en el ganado a escala mundial, con una presencia endémica en regiones de los cinco continentes y alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales (2), que produce considerables pérdi-

das económicas en la industria ganadera debido a la reducción significativa de la productividad y al incremento de la mortalidad (3).

A pesar del gran impacto económico de la anaplasmosis bovina, no se cuenta con una vacuna segura y eficaz para su control. La inmunización de bovinos con proteínas de membrana purificadas puede inducir protección contra la infección y la enfermedad

*Autor para la correspondencia: *Belkis Corona González*.
Correo electrónico: bcorona@censa.edu.cu.

(4). Algunas de estas proteínas han sido caracterizadas y designadas como Proteínas Principales de Superficie (MSPs, del inglés, *Major Surface Proteins*), MSP1 a MSP5, las cuales se han evaluado como posibles antígenos candidatos para la producción de vacunas y ensayos de diagnóstico (5).

Sin embargo, algunas de estas proteínas varían entre aislamientos e incluso dentro de un mismo aislamiento, en dependencia del ciclo de la rickettsiemia y la variabilidad genética, por lo que esto constituye uno de los factores que deben considerarse en la evaluación de candidatos vacunales, ya que puede resultar en polimorfismo antigénico significativo e impedir la protección cruzada entre aislamientos (6).

Estudios previos han identificado más de 20 nuevas proteínas inmunogénicas, subdominantes, en la fracción de membrana externa de *A. marginale*, entre las que se encuentran VirB9, VirB10, la proteína conjugada de transferencia (CTP) y el factor de elongación-Tu (EF-Tu). VirB9, VirB10 y CTP se consideran parte del sistema de secreción de tipo IV (T4SS, del inglés, *Type four secretion system*), que media la secreción o la transferencia célula-célula de macromoléculas, proteínas y complejos de proteína-ADN en bacterias Gram negativas. EF-Tu se puede localizar en la superficie bacteriana mediando la adhesión a las células hospederas, o en el citoplasma bacteriano durante la síntesis de proteínas (7). Estas proteínas inducen respuesta de células TCD4⁺, incluyendo la producción de interferón gamma (IFN- γ) y se reconocen por IgG2 en ganado inmunizado con vacunas de membrana externa (8, 9). Recientemente, CTP cambió su nomenclatura a VirB9-1 y VirB9 a VirB9-2, debido a su homología con las proteínas correspondientes en *Anaplasma phagocytophilum* (10).

El presente trabajo tiene como objetivo verificar que los genes que codifican para las proteínas VirB9-1, VirB9-2, VirB10 y Ef-Tu del aislamiento Habana de *A. marginale* se transcriben durante la infección en el bovino.

La extracción del ARN de *A. marginale* se realizó a partir de la sangre de un animal esplenectomizado, experimentalmente infectado con el aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*. La sangre se lavó con PBS y se conservó con 30% de glicerol a -20°C hasta su uso. La extracción del ARN se realizó mediante la combinación de dos métodos. En un primer momento se empleó el reactivo TRI Reagent® LS (Sigma, EE.UU), según las instrucciones del fabricante hasta que se obtuvo la fase acuosa. A la misma se le adicionó etanol absoluto (Merck) y a partir de este paso se continuó la extracción de acuerdo a las instrucciones

del fabricante del juego de reactivos AllPrep DNA/RNA (Qiagen). El ARN se resuspendió en 30 μ l de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, USA).

A partir del RNA total extraído se sintetizó la cadena de ADN complementaria al ARN con el uso de la reverso transcriptasa del virus de la leucemia Moloney-Murina (M-MLV RT) (Promega, Madison, WI, USA) en un volumen final de reacción de 20 μ l. Se incubaron 5 μ l del ARN extraído con 4 μ l de cebadores *random* (50 ng/ μ l) (Promega, Madison, WI, USA) y 1 μ l de dNTPs (10 mM) a 70°C durante 10 min. A continuación, la mezcla se colocó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 4 μ l de la solución tampón de reacción 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8.3 a 25°C); 37,5 mM KCl; 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT], 0.5 μ l de inhibidor de ribonucleasas [RNAsin (40U/ μ l)] (Promega, Madison, WI, USA), 0.8 μ l de M-MLV RT (200 U/ μ l) (Promega, Madison, WI, USA) y 4.7 μ l de agua libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó durante 15 min a 25°C, seguida de 37°C durante 1 hora y un paso de desnaturalización final a 94°C, durante 5 min.

El cDNA sintetizado a partir del RNA del aislamiento Habana de *A. marginale*, se utilizó para la amplificación de los genes *virB9-1*, *virB9-2*, *virB10*, y *Ef-Tu*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia de los cebadores utilizados aparece en la Tabla 1.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, que contenía 5 μ l de cDNA, 0.4 μ M de cada cebador, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C durante 10 min, en un termociclador Eppendorf Mastercycler.

Los resultados del PCR se aplicaron en geles de agarosa (Sigma) al 1%, en tampón TBE 0.5 X; se corrieron a 100 Volts y 50 mA, en cámara de electroforesis (Pharmacia LKB - GPS 200/400) durante 35 minutos en tampón de corrida TBE 0.5X, con Bromuro de Etidio (0.5 μ g/ml). Los resultados se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB MacroVue) y se fotografiaron con cámara digital (Sony Cyber-shot) de 4.1 megapíxeles. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

Los productos de PCR correspondientes a los genes de las proteínas de membrana VirB9-1, VirB9-2, VirB10 y Ef-Tu del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale* se muestran en la Figura 1. Los amplicones de 812pb, 840pb, 1338pb, y 1118pb coinciden con las

TABLA 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los genes *virB9-1*, *virB9-2*, *virB10*, y *Ef-Tu* del aislamiento Habana de *A. marginale*./ *Sequence of the primers used for amplification of the virB9-1, virB9-2, virB10, and Ef-Tu genes of A. marginale Habana isolate.*

Genes	Cebador Sentido (5' - 3')	Cebador Reverso (5' - 3' ^{ca})	Referencia
<i>virB9-1</i>	ATGAAAAAGGCTTTCATGGTTTGTGCTGTAGCGC	CCCACGTCCCCTTCTG ^a	Lopez <i>et al.</i> (9)
<i>virB9-2</i>	ATGAATTTCTATAAAAACTTGCTTGCG	AAGCACCGTATTCACTACTTCGAC ^a	Lopez <i>et al.</i> (9)
<i>virB10</i>	TTGAGTTTAGGGATGTCAGACGAAACCAAGG	CCTACGCACCGCCTCCCTAG ^a	Lopez <i>et al.</i> (9)
<i>Ef-Tu</i>	ATGACAGAAGGGAGAAAGCC	CTACTCCAAAATCTCAGTTATGATAC	Junior <i>et al.</i> (11)

^aLos cebadores reversos no contienen la secuencia FLAG de 30-nucleótidos descrita por Lopez *et al.* (9).

tallas descritas por Vidotto *et al.* (12) para el gen *virB9-2*, así como por Lopez *et al.* (9) y Corona *et al.* (13) para el resto de los genes.

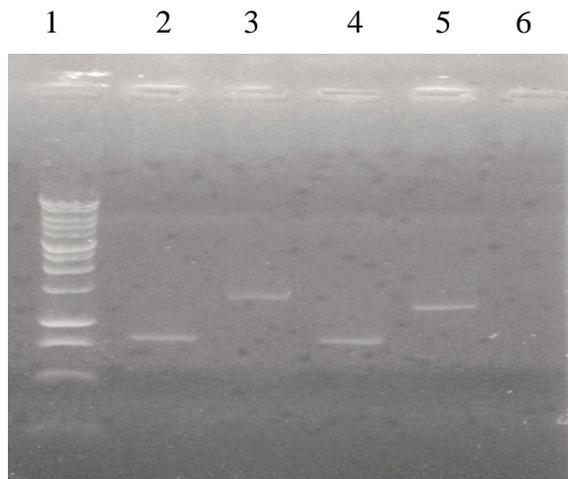


FIGURA 1. Amplificación por PCR de los genes *virB9-1*, *virB9-2*, *virB10* y *Ef-Tu* del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*. 1: Marcador de peso molecular de 1kb (Promega); 2: gene *virB9-2*; 3: gene *virB10*; 4: gene *virB9-1*; 5: gene *Ef-Tu*; 6: Control de agua./ *PCR amplification of the genes virB9-1, virB9-2, virB10 and Ef-Tu of A. marginale Habana isolate. 1:1 kb DNA Ladder Molecular Weight Marker (Promega); 2:gene virB9-2; 3: gene virB10; 4: gene virB9-1; 5: gene Ef-Tu; Control water.*

Como se observa en la Figura 1, todos los genes analizados se amplificaron a partir del cDNA, lo cual indica su posible expresión durante la infección en el bovino; estas proteínas representan la posibilidad de contar con una importante alternativa para el desarrollo de vacunas. Lopez *et al.* (9) mostraron que en los

bovinos inmunizados con proteínas de membrana externa, las proteínas VirB9-1, VirB9-2 y VirB10 produjeron proliferación significativa de linfocitos TCD4+, segregación de IFN- γ y producción de IgG2. Por su parte, Araújo *et al.* (14) y Lopez *et al.* (7) expresaron EF-Tu en *Escherichia coli* y la proteína recombinante fue capaz de inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T y títulos de IgG2 superiores a IgG1; se demostró así su capacidad para la inmuoestimulación.

La función de estas proteínas en *A. marginale* no se ha determinado, pero en un patógeno que se encuentra bajo evolución reductiva, la retención de estos genes indica su requerimiento para la invasión y la supervivencia dentro del eritrocito y las células de garrapatas (15), por lo que recomendamos se continúen los estudios de evaluación de estas proteínas como posibles candidatos vacunales para *A. marginale*, si tenemos en cuenta que la conservación genética y antigénica de una proteína protectora es importante para su eficacia como vacuna. Por tanto, la identificación de proteínas de membrana altamente conservadas es una prioridad para el desarrollo de vacunas contra la anaplasmosis.

REFERENCIAS

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker C, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families' Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Micr.* 2001;51(6):2145-2165.

2. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2010;167(2-4):95-107.
3. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):698-712.
4. Tebele N, McGuire TC, Palmer G. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. *Infect Immun.* 1991;59(9):3199-3204.
5. Alleman AR, Palmer GH, McGuire TC, McElwain TF, Perryman LE, Barbet AF. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. *Infect Immun.* 1997;65(1):156-163.
6. Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes Infect.* 2000;2:167-176.
7. Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, et al. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. *Infect Immun.* 2005;73(12):8109-8118.
8. Lopez JE, Beare PA, Heinzen RA, Norimine J, Lahmers KK, Palmer GH, et al. High-throughput identification of T-lymphocyte antigens from *Anaplasma marginale* expressed using in vitro transcription and translation. *J Immunol Methods.* 2008;332(1):129-141.
9. Lopez JE, Palmer GH, Brayton KA, Dark MJ, Leach SE, Brown WC. Immunogenicity of *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine. *Infect Immun.* 2007;75(5):2333-2342.
10. Suttan EL, Norimine J, Beare PA, Heinzen RA, Lopez JE, Morse K, et al. *Anaplasma marginale* type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine. *Infect Immun.* 2010;78(3):1314-1325.
11. Junior DS, Araujo FR, Almeida Junior NF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, et al. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):843-849.
12. Vidotto M, Venancio E, Vidotto O. Cloning, sequencing and antigenic characterization of rVirB9 of *Anaplasma marginale* isolated from Parana State, Brazil. *Genet Mol Res.* 2008;7(2):460-466.
13. Corona B, Martínez S, Massard CL, Henrique Da Fonseca A, Sandes M, Peckle M, et al. Identificación de los genes que codifican para las proteínas VirB9, VirB10, proteína conjugal de transferencia y el factor de elongación-Tu de un aislamiento cubano de *Anaplasma marginale*. *Rev Salud Anim.* 2015;37(1):10-14.
14. Araújo FR, Costa CM, Ramos CA, Farias TA, de Souza IIF, Melo ES, et al. IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9, VirB10, and elongation factor-Tu. *Mem I Oswaldo Cruz.* 2008;103(2):186-190.
15. Gillespie JJ, Ammerman NC, Dreher-Lesnick SM, Rahman MS, Worley MJ, Setubal JC, et al. An anomalous type IV secretion system in *Rickettsia* is evolutionarily conserved. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4833.

Recibido: 14-10-2015.

Aceptado: 29-2-2016.