

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG)

NÚCLEO DISCIPLINAR/ COMITÉ ACADÉMICO: Biotecnología, Salud Pública

TÍTULO DEL TRABAJO: **GENOTECA DE cDNA NORMALIZADA DE *Rhodnius prolixus***

DIRECTOR: Rivera Pomar Rolando

AUTOR(ES): Lavore, Andrés Esteban; Pagola, Lucia Elena

TELÉFONO DEL AUTOR: (011)4257-9775

E-MAIL DEL AUTOR: alavore@creg.org.ar

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG)

NÚCLEO DISCIPLINAR/ COMITÉ ACADÉMICO: Biotecnología, Salud Pública

TÍTULO DEL TRABAJO: **GENOTECA DE cDNA NORMALIZADA DE *Rhodnius prolixus***

DIRECTOR: Rivera Pomar Rolando

AUTOR(ES): Lavore, Andrés Esteban; Pagola, Lucia Elena

TELÉFONO DEL AUTOR: (011)4257-9775

E-MAIL DEL AUTOR: alavore@creg.org.ar

Introducción.

Rhodnius prolixus (Stål, 1859; Heteroptera: Reduviidae) es el principal vector de la enfermedad de Chagas en el norte de sudamérica y en américa central. Este insecto, pertenece al orden Hemiptera y ha sido ampliamente estudiado en los campos de la biología y fisiología, pero aún se cuenta con información de su genoma. Una forma de analizar los genes que se expresan en un organismo es mediante el secuenciamiento al azar de genotecas funcionales de ADNc. Esto nos permite obtener secuencias correspondientes a genes en un momento dado del ciclo de vida y hacer un estudio de la expresión de dichos genes en distintas condiciones fisiológicas. La abundancia diferencial de algunos transcriptos en un tipo particular de célula, tejido u organismo, hace que sea necesario normalizar dichas frecuencias para facilitar la búsqueda de genes raros de interés.

Usualmente el 20 % de la masa total de ARNm está representada por alrededor de 20 genes abundantes (miles de copias de mensajeros por célula), un 60% de la masa total de ARNm está representado por varios cientos de genes expresados con abundancia media (cientos de copias de mensajeros por célula) y un 20% está representado por mensajeros, producto de la expresión de genes raros (<10 copias de mensajero por célula) (Carninci et al., 2000). De esta forma, los métodos convencionales de producción de genotecas son buenos para la producción de genotecas cuantitativas, no así para genotecas cualitativas debido a la probable exclusión de genes poco expresados. La solución a esto se encuentra en someter a la genoteca a un proceso de normalización.

El proceso de normalización de una genoteca implica la nivelación en la representación de cada cDNA por medio de la eliminación selectiva de los transcritos más abundantes, incrementando de esta forma la probabilidad de encontrar transcritos poco abundantes. En una normalización perfecta hipotética, cada transcripto estaría representado solo una vez, independientemente de la abundancia. Es por eso que las genotecas normalizadas son ideales para el descubrimiento de los genes activos (no así para estudiar los niveles de expresión) y por ello deben cubrir todo el espectro de expresión.

Existen varias maneras de normalizar una genoteca primaria. En su gran mayoría incluyen reacciones de reasociación cinéticas de segundo orden. Estas técnicas incluyen la separación, mediante el uso de columnas de hidroxapatita, de la fracción simple cadena de cDNA de la doble cadena de cDNA (Soares, 1994, Bonaldo, 1996) o por el uso de camas magnéticas (Carninci, 2000), digestión de la fracción ds cDNA mediante el uso de endonucleasas de restricción y amplificación de la fracción simple cadena cDNA (ssDNA) mediante PCR supresiva. Estas técnicas no son recomendadas para la producción de genotecas normalizadas enriquecidas en fragmentos de cDNA largos. Las causas radican en que, 1) durante la amplificación de la library en plasmidos, los fragmentos cortos de cDNA se ligan con mayor facilidad que los de mayor longitud; 2) la PCR supresiva es solo aplicable a fragmentos cortos, mientras que los fragmentos de mayor longitud y abundantes no serían eliminados; 3) los métodos que utilizan endonucleasas de restricción, favorecen a aquellos transcritos que forman estructura secundaria; y 4) los métodos basados en matrices sólidas son menos eficientes que aquellos en donde la hibridación se da en solución.

El objetivo del presente trabajo es generar una genoteca normalizada de *Rhodnius prolixus*, enriquecida en fragmentos de cDNA largos, utilizando un método de normalización basado en una nucleasa termoestable (nucleasa específica de ADN de doble cadena del cangrejo de Kamchatka o *Kamchatka Crab Duplex-Specific Nuclease*, KCDSN, (Zhulidov et al., 2004), y LD-PCR (*Long Distance-PCR*) de acuerdo al protocolo descrito por Anisimova et al., (2006). El método se basa en la degradación de la fracción ds cDNA mediante el uso de una nucleasa que tiene especificidad por la doble cadena (DSN). Este método involucra la desnaturalización y renaturalización del cDNA, la degradación de la fracción doble cadena de cDNA (dsDNA), por parte de la nucleasa, y la posterior amplificación de la fracción ds cDNA. El proceso de reasociación de cadenas tiene una cinética de primer orden, en la que los transcritos más abundantes se asocian más rápidamente que los de menor concentración. Por lo tanto al cabo de un cierto tiempo la nucleasa cortará en mayor proporción, transcritos abundantes. Posteriormente, la nucleasa es inactivada y el ADN no cortado es amplificado en dos ciclos de PCR.

La DSN tiene su máxima actividad a una temperatura de entre 60 – 70 °C, y además se caracteriza por tener una mayor afinidad por el ds cDNA y por los híbridos de ARN-ADN, que por el ss cDNA (Zhulidov, 2004).

Materiales y métodos.

Rhodnius prolixus

Para este trabajo se utilizaron adultos, ninfas I a V y huevos embrionados de *Rhodnius prolixus*. Estos fueron obtenidos de la colonia establecida en el insectario del CREG. Los insectos se mantienen a una temperatura de 30°C con una humedad relativa del 50%. A partir de la alimentación de adultos, los huevos son recolectados cada 5 días para cubrir de manera homogénea los distintos estadios embrionarios. Se utilizaron adultos y las ninfas, tanto alimentados como sin alimentar, de forma tal de que queden representados ambos estados fisiológicos.

Extracción de mRNA.

El ARNtotal se extrajo por medio de la técnica de tiocianato de guanidinio-fenol ácido (Chomzynski y Sacchi, 1988) modificada, en la cual la extracción con fenol ácido se reemplaza por fenol neutro y precipitación del ARN con cloruro de litio.

Síntesis de cDNA.

El cDNA se sintetizó mediante el SMART cDNA Library construction Kit (Clontech). Este método utiliza para la producción de ss cDNA una transcriptasa reversa y un cebador de oligodT20, el CDS III/3'Primer.

5'-CG(*Sfi*I-A)CATAACTTCGTATAGCATACATTATATTACGGTGNNNNN-T₁₈-3'

A partir de ss cDNA se sintetizó ds cDNA mediante el Advantage 2 PCR Kit (Clontech) el cual incorpora un SMART IV Oligonucleotido,

5' (*Sfi*I-B) GATAACTTCGTATAGCATACATTATGCAGGCTN3'

y una Polimerasa Mix. Tanto el CDS III/ 3'primer, como el SMART IV Oligonucleotido poseen sitios de corte para la encima de restricción Sfi I, con el fin de proveer mayor afinidad para la ligación al vector de clonado.

Normalización.

Para llevar a cabo la normalización de la genoteca de *R. Prolixus* se utilizó el Trimmer-Direct cDNA normalization kit (evrogen). Este método involucra la desnaturalización del cDNA, en donde este se incubó a 98°C por 2 minutos; su posterior renaturalización, durante la cual se lo incubó a 68°C por 5 horas; la degradación de la fracción ds cDNA mediante la DSN y la amplificación de la fracción restante sometiéndola a dos ciclos de PCR.

La digestión de la fracción ds cDNA se realizó a 68 °C por un lapso de 25 minutos. Esto fue realizado tanto con la DSN diluida a ¼, ½, como sin diluir, con el fin de determinar la concentración de la nucleasa a la cual la genoteca se normaliza en mayor grado.

Fraccionamiento del cDNA.

El fraccionamiento del cDNA se realizó mediante columnas de Croma Spin-400 (Clontech) y las fracciones analizadas en geles de agarosa. Las fracciones conteniendo insertos de más de 0.5 kb serán reunidas, precipitadas con etanol y el producto ligado en el vector de clonado.

Vector de clonado y bacterias competentes.

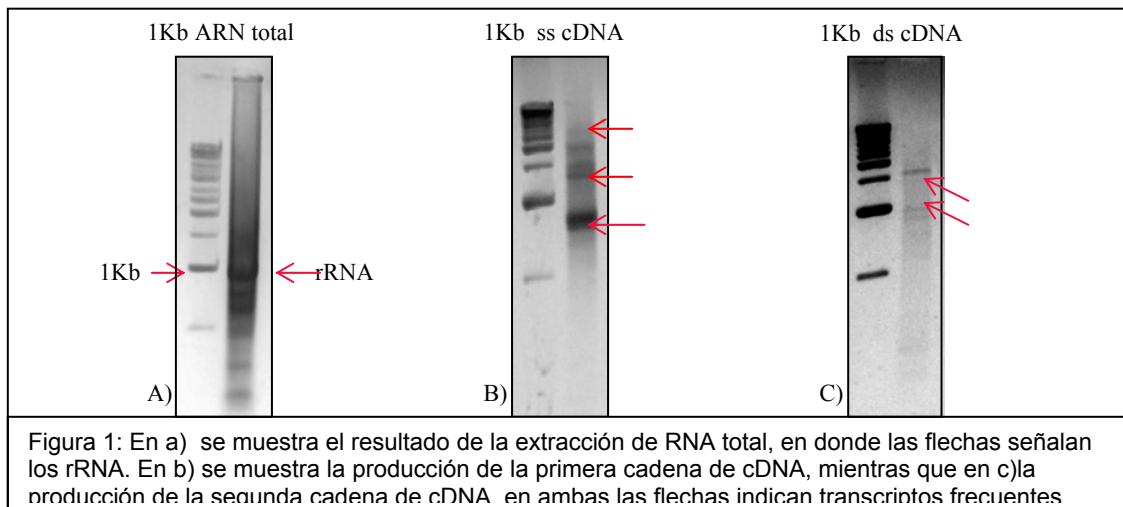
El cDNA fue ligado λTriplEx2 (Phago), el cual es provisto junto con el SMART cDNA Library Constuction Kit (Clontech). Este vector incluye sitios de restricción para Sfi1-A y Sfi1-B, lo cual favorece el clonado direccional de los insertos. Este vector proporciona la ventaja de obtener genotecas con un alto título, permite diferenciar clones recombinantes por medio de colonias azules o blancas, y da la posibilidad, mediante subclonado, de convertir el λTriplEx2 a pTriplEx2 (plasmido) por medio de una Cre-recombinasa.

Para incorporar el fago a las bacterias se utilizó un sistema de empaquetamiento de fagos, el GigIII gold packagin, (Stratagene). De esta forma el λTriplEx2, es introducido a las bacterias y de esta forma amplificado exponencialmente. Las bacterias utilizadas para la amplificación fueron E.coli de la cepa XL1-Blue, las cuales permiten diferenciar a los clones recombinantes por medio de colonias blancas y azules.

Por otro lado bacterias de la cepa BM25.8 (provistas en el SMART cDNA Library Construction Kit) fueron utilizadas para la conversión del vector de la forma fago a plasmido, por medio de una recombinasa que las bacterias expresan. Una vez extraídos los plásmidos se procedió a la secuenciación de los clones.

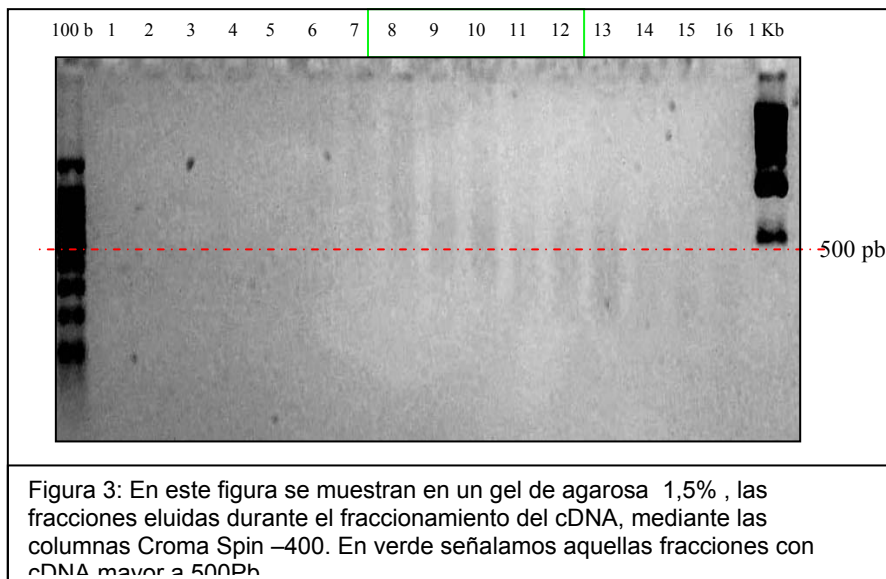
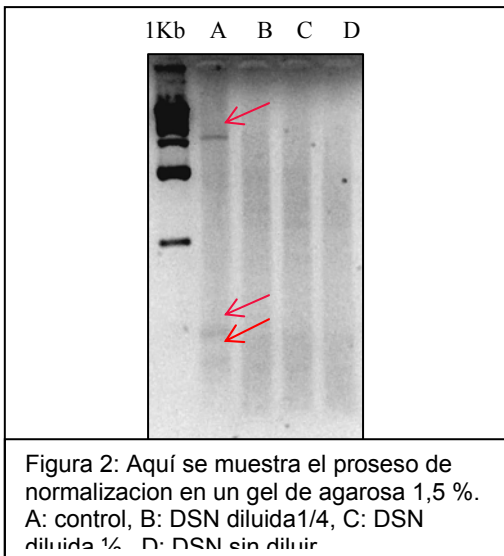
Resultados

En esta sección mostramos parte de los resultados obtenidos hasta el momento. En la figura 1 se resumen los resultados obtenidos, desde la extracción de mRNA hasta la producción de cDNA doble cadena. En el caso del ss cDNA y el ds cDNA se puede apreciar claramente la presencia de transcritos que se encuentran en gran abundancia, en especial entre las 500 y las 3000 pb (Fig. 1 a y b).



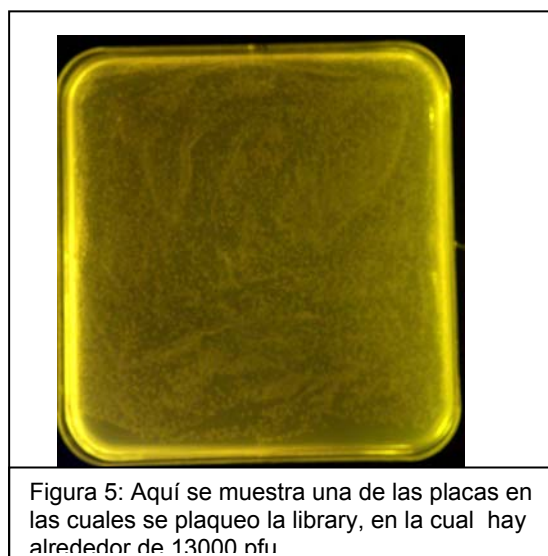
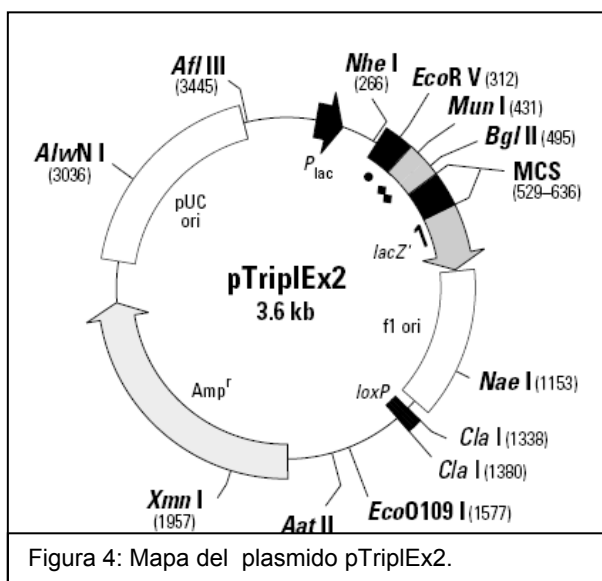
El cDNA doble cadena, fue sometido a una ronda de normalización. Los resultados se muestran en la figura 2. En esta figura se puede ver claramente que la fracción tratada con la enzima sin diluir (calle D del gel que se muestra en la figura 2) es aquella en donde la normalización fue mas efectiva, apreciándose una reducción notable en los cDNAs mas frecuentes.

Una vez realizada la normalización se procedió al fraccionamiento del cDNA mediante las columnas Croma Spin-400 (Clontech). El fraccionamiento se ilustra en la figura 3, en donde además se señalan la fracciones eluidas que poseían un tamaño superior a los 500 Pb, las cuales fueron usadas para ligar posteriormente el vector de clonado.



Una vez fraccionado el cDNA, se procedió a ligar este cDNA al vector λ TripIEx2 (Fig. 4), y posteriormente el fago fue empaquetado en las capsides proteicas e introducido a las bacterias de la cepa XL1-Blue, en las cuales el vector se amplificó exponencialmente, y mediante las cuales se seleccionó a los clones recombinantes, los cuales estaban representados por las colonias de color blanco.

El plaqueo de la library se muestra en la figura 5, donde se obtuvo alrededor de 13000 colonias por placas.



Una vez llevada a cabo la amplificación de la library, se procedió a conversión del λ TriplEx2 a pTriplEx2, mediante las bacterias de la cepa BM25.8, las cuales tienen la capacidad de expresar la Cre-recombinasa, la cual es la que produce la circularización del vector.

Discusión

Los clones obtenidos se encuentran en este momento en proceso de secuenciación. En una segunda etapa se procederá al tratamiento bioinformático de los ESTs obtenidos y a la búsqueda de genes involucrados con la defensa inmune inespecífica y genes del desarrollo embrionario de este importante vector de la enfermedad de Chagas.

Referencias.

- Anisimova VE, Rebrikov DV, Zhulidov PA, Staroverov DB, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Renaturation, activation, and practical use of recombinant duplex-specific nuclease from Kamchatka crab. *Biochemistry (Mosc)* 71:513-519. 2006.
- Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res* 6:791-806. 1996.
- Carninci P, Shibata Y, Hayatsu N, Sugahara Y, Shibata K, Itoh M, Konno H, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y. Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res* 10:1617-1630. 2000.
- Chomczynsky, P; Sacchi, N. Single step method of Rna isolation by acis guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162 157 – 159. 1987.
- Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9228-9232. 1994.

Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, Shagin DA. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res* 32:e37. 2004.