

KMP-11, una proteína abundante en la superficie de los kinetoplástidos

KMP-11, a major membrane protein from the surface of kinetoplastids

BERBERICH, C.; FUERTES, M. A.; MACHADO, G. y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Universidad Autónoma de Madrid.
Cantoblanco. 28049 Madrid.

RESUMEN

La proteína KMP-11 es una de las moléculas mayoritarias de la membrana de los kinetoplástidos. El alto grado de homología de esta secuencia de 92 aminoácidos y su presencia en todas las especies hasta ahora analizadas apuntan hacia una proteína de importancia en la biología de los kinetoplástidos. KMP-11 destaca por su alto contenido de estructura en alfa-hélice, su estabilidad a altas temperaturas y a cambios de pH. La expresión es dependiente de la fase del ciclo de vida de los parásitos limitando la presencia de la proteína a promastigotes donde forma parte de un compartimento estructural o funcional adyacente y alrededor del flagelo. Desde el punto de vista inmunológico KMP-11 puede ser considerada como un proteína de alto interés debido a su antigenicidad y efecto estimulador de la proliferación de linfocitos T en infecciones con *Leishmania*.

Palabras clave: kinetoplástidos. *Leishmania infantum*. Lipofosfoglicano (LPG). KMP-11. Organización genómica. Análisis de secuencia. Antigenicidad. Expresión. Inmunofluorescencia. Dicroísmo circular.

ABSTRACT

The protein KMP-11 is one of the major constituents of the kinetoplastid-membrane. The high degree of homology in the amino acid sequence of its 92 residues together with the fact that the molecule is present in all species so far analyzed suggest that the protein is of importance for the kinetoplastid-biology. Noteworthy is the high degree of alpha-helical conformation within its secondary structure and its stability even at temperatures that normally denature most proteins. Expression of the protein is under tight stage-specific control limiting its presence to the promastigote stage of the parasite where it seems to form part of a structural or functional compartment close to and along the flagellum. KMP-11 is also an interesting protein from the immunological point of view since it could be shown to be highly antigenic and to stimulate proliferation of T-lymphocytes during *Leishmania* infections.

Keywords: kinetoplastids. *Leishmania infantum*. Lipophosphoglycan (LPG). KMP-11. Genomic organization. Sequence analysis. Antigenicity. Expression. Immunofluorescence. Circular dichroism.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 237-244]

Los Protozoos del orden kinetoplastida son organismos unicelulares que destacan por poseer una sola mitocondria especializada, el kinetoplasto, adyacente al cuerpo basal del flagelo. Su matriz contiene una compleja red de mini- y maxicírculos de DNA cuya organización es característica de cada género dentro de este orden.

Todos los kinetoplástidos son parásitos que se agrupan en dos categorías: los que pasan su ciclo de vida alternando entre dos hospedadores, por lo general un hospedador vertebrado y otro invertebrado, y los que viven en un único huésped. De los parásitos con dos huéspedes destacan los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, peligrosos patógenos humanos de impacto mundial. La leishmaniosis, causada por especies de *Leishmania*, la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad del sueño, causada por trypanosomátidos africanos representan serios desafíos para la salud mundial, por lo que su control y erradicación son objetivos prioritarios de la OMS. Se estima que sufren de leishmaniosis alrededor de 12 millones de personas en el mundo apareciendo unos 400.000 casos nuevos al año (1).

El gran avance en tecnologías como la ingeniería genética ofrece hoy en día una seria expectativa hacia el desarrollo de una vacuna sintética contra estas enfermedades. Una de las estrategias para el diseño de dicha vacuna se centra en el estudio de algunas moléculas abundantes de la superficie de los parásitos. Ensayos en animales han demostrado que la inmunización con algunas de estas moléculas ha generado una respuesta inmune parcialmente protectora contra el parásito.

En *Leishmania* están descritas y parcialmente caracterizadas hasta ahora 3 tipos de moléculas mayoritarias de la membrana: el lipofosfoglicano (LPG), la metaloproteínasa gp63 y el antígeno de la superficie de los promastigotes, la PSA. Hace poco, el grupo de Jardim descubrió una nueva y abundante proteína en la superficie de *Leishmania donovani* (2,3,4). Por su supuesta estrecha relación con los LPGs, con los que forma un complejo estable durante el proceso de purificación, se la denominó proteína asociada a LPG, LPGaP. Posteriormente fue rebautizado como kinetoplastid-membrane protein 11 (KMP-11) debido a su presencia en todas las especies de kinetoplástidos hasta ahora analizadas. Con un estimado número de $1-2 \times 10^6$ copias por parásito representa una de las proteínas más abundantes de la membrana de *Leishmania*. Su descubrimiento fue bastante curioso: se sabe desde hace ya algunos años que los LPGs forman una cubierta especial en *Leishmania* determinando la virulencia y la supervivencia del parásito en su célula

hospedadora, el macrófago (5). En particular, están implicados en la adhesión de los parásitos a receptores de los macrófagos y representan una de las armas de defensa del parásito que le permite sobrevivir en el ambiente hostil de los fagolisosomas dentro del macrófago. Inhiben, por ejemplo, la actividad de la proteína quinasa C alterando así la cascada de señales en la célula que normalmente activa los mecanismos del "respiratory burst" en el macrófago y la expresión de genes como c-fos. Destaca además el supuesto papel inmunológico de los LPGs: Ratones de la cepa susceptible Balb/c se mostraban resistentes frente a una infección con *Leishmania major* al ser previamente inmunizados con LPGs (6). Además inducían una fuerte proliferación de linfocitos T en pacientes recién recuperados de una infección con *Leishmania* (7,8) indicando que los LPGs desempeñan un papel clave en la inmunobiología de la relación parásito - huésped. Sin embargo era bastante difícil reconciliar estos datos con el concepto actual de cómo interaccionan los receptores T de los linfocitos con epítomos T presentados por células como los macrófagos. Es decir, no se entendía cómo una molécula de naturaleza lipofosfoglicano podía actuar como un epítomo T y hacer proliferar linfocitos T. Este dilema se resolvió cuando el grupo de Jardim y col. (2) pudo demostrar que estos efectos reflejaban en realidad la presencia de una proteína "contaminante" en la fracción de los LPGs. Utilizando técnicas sofisticadas de la bioquímica lograron finalmente separar y purificar esta proteína de los LPGs.

Nuestros estudios con la KMP-11 de *Leishmania infantum*, el agente etiológico de leishmaniosis canina y humana en España, confirman que se trata de una proteína de tan sólo 11 kDa y probablemente glicosilada como parece ser típico en proteínas de superficie en tripanosomátidos. Estudios sobre la organización genómica de la KMP-11 demuestran que el locus contiene tres copias del gen, denominadas copia A, B, C (ver Figura 1). La secuenciación de las copias B y C reveló un alto grado de homología con la secuencia de la KMP-11 de *Leishmania donovani* recientemente publicada (4) A nivel de aminoácidos la diferencia se reduce a tan solo dos cambios entre las dos especies (ver Figura 2). La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de la copia B y C muestra además dos cambios entre ellos, demostrando que las copias en el locus genómico de la KMP-11 no son 100% idénticas. El alto grado de homología en la KMP-11 observado en dos diferentes especies sugiere que se trata de una proteína muy conservada de función posiblemente importante para la biología del parásito.

Para aportar algunos datos sobre el papel inmunológico de esta proteína la sobre-expresamos en bacterias utilizando un vector de expresión que permite obtener grandes cantidades de una proteína recombinante en un estado muy puro (ver Figura 3a). El test de antigenicidad en ensayos de Elisa con 25 sueros obtenidos de perros infectados de forma natural con *Leishmania infantum*

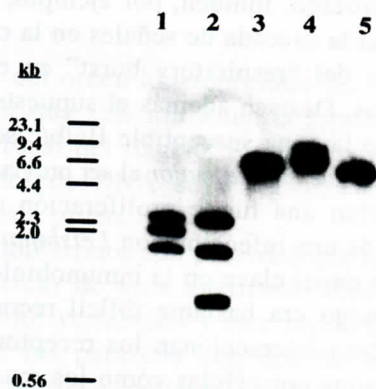
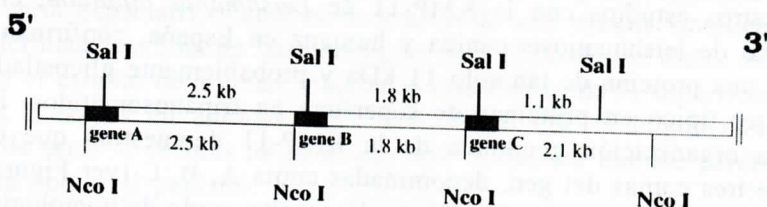
A**B**

Fig. 1.—Southern blot mostrando la organización genómica del locus de KMP-11 en *Leishmania infantum*. (A) 3 ug de DNA genómico fueron digeridos con varias enzimas de restricción, los fragmentos transferidos a un filtro de nylon y subsecuentemente hibridados con una sonda específica de la KMP-11. Las enzimas son: 1, NcoI, 2, SalI, 3, XhoI, 4, BamHI, 5, HindIII. (B) Representación esquemática del locus KMP-11.

demonstró que la KMP-11 era reconocida en el 96% de los casos por anticuerpos presentes en los sueros caninos (ver Figura 3c). La tasa de reconocimiento es un poco más baja en sueros humanos con una sensibilidad de aproximadamente el 70%. Sueros de control humanos o caninos (no-infectados) no reaccionan con la proteína, demostrando que la especificidad de reconocimiento es muy alta. Estos resultados permiten concluir que la proteína KMP-11 es un

	M A T T Y E E F S A K L D R L G E		
1	ATGgccaccacgtacgaggagttttcggcgaagctggaccgcctgggtga	50	Li-gene B
a.....		Li-gene C
a.c.		Ld
	E F N R K M Q E Q N A K F F A D		
51	ggagttcaacaggaagatgcaggagcagaacgccaagttctttgcgga	100	Li-gene B
		Li-gene C
		Ld
	K P D E S T L S P E M K E H Y E K		
101	agccggatgagtcgacgctgtcgcccagatgaaggagcactacgagaag	150	Li-gene B
		Li-gene C
ga.....		Ld
	F E R M I K E H T E K F N K K M H		
151	ttcgagcgcgatcaaggagcacacagagaagttcaacaagaagatgca	200	Li-gene B
g.....		Li-gene C
a.....		Ld
	E H S E H F K Q K F A E L L E Q		
201	cgagcactcggagcacttcaagcagaagttcgcgagctgctggagcagc	250	Li-gene B
		Li-gene C
C.....		Ld
	Q K A A Q Y P S K		
251	agaaggctgcgcagtacctccaagTAA	279	Li-gene B
		Li-gene C
g.....		Ld

Fig. 2.—Secuencia de nucleótidos de la región codificante de la KMP-11. Se muestra la secuencia completa de 276 bp del *Leishmania infantum* gen B (Li-gene B) y se la compara con la secuencia del gen C (Li-gene C) y la secuencia publicada de *Leishmania donovani* (Ld). Las diferencias están indicadas con letras correspondientes. Arriba de la secuencia del gen B se muestra la secuencia deducida de aminoácidos.

potente antígeno que provoca una fuerte respuesta humoral específica durante infecciones con *Leishmania*. Dada la ausencia de esta proteína en no-kinetoplastidos, una proteína tan antigénica podría ser utilizada con sensibilidad y alta especificidad como herramienta en el diagnóstico de la leishmaniosis. Como todos los datos de la literatura apuntan a un papel clave de los linfocitos T en la resolución de la enfermedad, estamos ahora muy interesados en conocer los resultados de ensayos en animales que hemos puesto en marcha para averiguar el potencial proliferador de células T. Por último podemos preguntarnos si esta proteína tiene un papel general inmunoprotectivo frente a infecciones con *Leishmania* como sugieren los experimentos anteriores de inmunización con LPGs (6).

La función biológica de la KMP-11 se desconoce aún, si bien existen especulaciones basadas en cierta homología de esta proteína con las apolipoproteínas de mamíferos sugiriendo un papel clave en la regulación de la presión y consistencia de la membrana. Como tampoco existen datos claros sobre la expresión de esta proteína en diferentes fases de la vida del parásito,

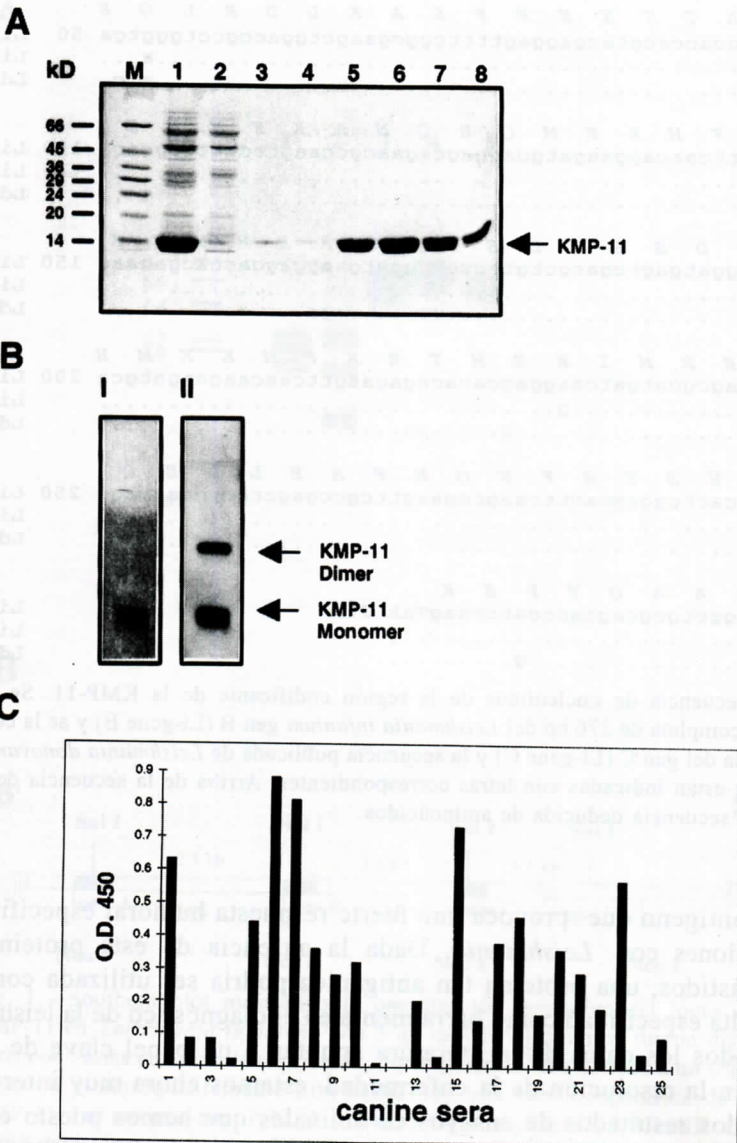


Fig. 3.—Expresión y análisis de antigenicidad de la KMP-11. (A) SDS-PAGE-análisis de la expresión y purificación de la proteína recombinante con “His-tag”. (B) Western blot de la proteína recombinante con un suero obtenido de un perro con leishmaniosis visceral. (C) Reactividad de 25 sueros leishmanióticos en ensayos de FAST-ELISA.

comparamos su nivel de expresión en la fase promastigote, antes de la infección, y en la fase amastigote, el estado intracelular en el huésped. Utilizando un anti-suero policlonal pudimos mostrar que la expresión de esta proteína está casi exclusivamente limitada a promastigotes. En amastigotes la proteína aparece fuertemente “down-regulated” y no es detectable en western blots (datos no mostrados) sugiriendo que la función de la KMP-11 debe estar limitada a la fase promastigote del parásito.

Es sorprendente el patrón de inmunofluorescencia que muestra la proteína en promastigotes. La inmunofluorescencia se concentra sobre todo alrededor del flagelo y en la base del mismo mientras que aparece débil y difusa en el resto de la célula (ver Figura 4). Este patrón definido permite especular con que la KMP-11 pudiera formar parte de un compartimento estructural o funcional conectado con el flagelo. Por el contrario en amastigotes, la expresión está “down-regulated”, un hecho que podría estar relacionado con la desaparición del flagelo y que caracteriza morfológicamente este estadio. Estos resultados sugieren también otras funciones adicionales de la KMP-11 aparte de la propuesta estabilización de la membrana del parásito (3).



Fig. 4.—Inmunofluorescencia de la KMP-11. Promastigotes de *Leishmania infantum* fueron incubados con un anti-suero policlonal de conejo anti KMP-11. Como 2. anticuerpo un FITC-conjugado fue utilizado.

La KMP-11 parece tener una estructura secundaria de tipo "helix-turn-helix" como indica el blot de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos (3). Utilizando la técnica de dicroísmo circular, que se basa en el hecho que una proteína de determinada estructura absorbe luz polarizada con un patrón definido, no solamente se confirma el alto contenido de conformación α -hélice en la proteína recombinante (alrededor de 80%) sino que se muestra una sorprendente estabilidad de la estructura en ensayos de desnaturalización (datos no mostrados). La conformación de la proteína es estable hasta 50°C y a medida que se aumenta la temperatura va perdiendo progresivamente la estructura en α -hélice hasta que a 85°C está por completo enrollado, recuperando, sin embargo, su conformación nativa cuando al bajar nuevamente la temperatura. Cambios en el pH en el rango de 7 a 2 tampoco afectan la estructura de la proteína.

En resumen, todos los datos hasta ahora obtenidos con la KMP-11 indican que esta proteína de tipo "helix-turn-helix" desempeña un papel clave en la biología de los kinetoplastidos. El control de la expresión en las fases del ciclo de vida y la definida localización de la proteína en *Leishmania* sugiere que su función podría estar limitada a la forma promastigote donde forman parte de un compartimento estructural o funcional adyacente y alrededor del flagelo. Desde el punto de vista inmunológico la KMP-11 puede considerarse como una proteína de alto interés debido a su antigenicidad y efecto estimulador de la proliferación de linfocitos T en infecciones con *Leishmania*.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ASHFORD, R. W., DESJEUX, P., DERAAT, P.: *Parasitol Today* (1992), **8**:104-105.
- (2) JARDIM, A., TOLSON, D. L., TURCO, S. J., PEARSON, T. W., OLAFSON, R. W.: *J Immunol* (1991), **147**:3538-3544.
- (3) JARDIM, A., HANSON, S., ULLMAN, B., MCCUBBIN, W. D., KAY, C. M., OLAFSON, R. W.: *Biochem J* (1995), **305**:315-320.
- (4) JARDIM, A., FUNK, V., CAPRIOLI, R. M., OLAFSON, R. W.: *Biochem J* (1995), **305**:307-313.
- (5) TURCO, S. J., DECOUTEAUX, A.: *Annu Rev Microbiol* (1992), **45**:65-94.
- (6) MCCONVILLE, M. J., BACIC, A., MITCHELL, G. F., HANDMAN, E.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1987), **84**:8941.
- (7) JAFFE, C. L., SHOR, R., TRAU, H., PASSWELL, J. H.: *Clin Exp Immunol* (1990), **80**:77.
- (8) MENDONCA, S. C., RUSSEL, D. G., COUTINHO, S. G.: *Clin Exp Immunol* (1991), **83**:472-478.