

El antígeno de superficie PSA de *Leishmania infantum*: un nuevo miembro de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas

Leishmania infantum PSA surface antigen: a new member of the family of leucine rich repeat containing proteins

JIMÉNEZ-RUIZ *§, A.; BOCETA §, C. y ALONSO §, C.

* Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid. § Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Consejo superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid). 28049 Madrid.

RESUMEN

El antígeno PSA de *Leishmania infantum* presenta una elevada homología en su estructura primaria con los antígenos PSA-2 de *Leishmania major* y GP46/M2 de *Leishmania amazonensis*. El análisis de su secuencia de aminoácidos indica que el 60% de la molécula está constituida por 13 motivos repetidos con una longitud que oscila entre los 24 y 25 residuos. La secuencia consenso obtenida para estos motivos concuerda con la secuencia consenso descrita para los motivos repetidos ricos en leucinas, por lo que tanto la PSA de *L. infantum* como la PSA-2 de *L. major* y la GP46/M2 de *L. amazonensis* pueden ser clasificados como nuevos miembros de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas. La proteína recombinante y especialmente sus fragmentos expresados de forma independiente son reconocidos eficazmente por sueros obtenidos a partir de perros infectados por el parásito y de pacientes humanos con leishmaniasis.

Palabras clave: *Leishmania infantum*. Repeticiones ricas en leucinas. Organización genómica. Antigenicidad. Diagnóstico.

ABSTRACT

The primary structure of the PSA antigen from *Leishmania infantum* shows a high homology with *Leishmania major* PSA-2 antigen and *Leishmania amazonensis* GP46/M2 antigen. Amino acid sequence analysis indicates that 60% of the molecule is formed by 13 repeated motives 24-25 amino acids in length. The consensus sequence derived from these motives shows a highly significant homology with the consensus sequence described for leucine rich repeats, which indicates that *L. infantum* PSA, *L. major* PSA-2 and *L. amazonensis* GP46/M2 may be included into the newly described family of leucine rich repeat containing proteins. The expressed recombinant protein and several fragments expressed individually are efficiently recognized by sera from *L. infantum* naturally infected dogs and leishmaniasis human patients.

Keywords: *Leishmania infantum*. Leucine rich repeats. Genomic organization. Antigenicity. Diagnostic.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 295-303]

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoos intracelulares pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* que infectan tanto a vertebrados como a invertebrados. Su ciclo de vida se desarrolla en dos hospedadores distintos: un mosquito y un vertebrado. En el interior del mosquito el parásito vive como promastigote, el cual se desarrolla y multiplica cerca de las células epiteliales del intestino medio del insecto. Las formas maduras, denominadas promastigotes metacíclicos se liberan del intestino y migran hacia la probóscide para su transmisión. Cuando el mosquito se alimenta del mamífero, las formas metacíclicas entran en el sistema circulatorio de éste, donde se encuentran con moléculas del sistema de complemento, anticuerpos y células fagocíticas que son capaces de eliminar hasta el 80% de los promastigotes inoculados en la picadura (1). Los promastigotes supervivientes, al ser ingeridos por células del sistema fagocítico mononuclear, pasan a residir en los fagolisosomas donde se transforman en amastigotes, forma en la que se mantendrán durante toda su estancia en el huésped vertebrado. El ciclo se completa cuando un mosquito no infectado ingiere macrófagos de un huésped vertebrado infectado. Es importante indicar que ambas etapas del ciclo de vida de *Leishmania* transcurren en ambientes altamente hidrolíticos.

La superficie de los parásitos del género *Leishmania* posee una serie de moléculas destinadas por una parte a proteger al parásito de los ambientes hostiles en que éste se desarrolla y por otra a mediar la unión e internalización a los macrófagos del huésped. Entre estas moléculas destacan esencialmente la proteasa de superficie gp63 (2), el Lipofosfoglicano (LPG) (3), la proteína KMP 11 que se encuentra asociada a este último (4) y una familia de proteínas homólogas que han recibido distintos nombres según la especie analizada y que comprende el antígeno de superficie PSA-2 de *L. major* (5, 6, 7) y la glicoproteína gp46/M2 de *L. amazonensis* (8). Actualmente se conoce que proteínas homólogas a estas dos últimas existen en todas las especies de *Leishmania* analizadas excepto *L. braziliensis* (9). Originalmente, la gp46/M2 y la PSA-2 se describieron como proteínas de la superficie de los promastigotes y se pensaba que eran específicas de esta etapa. Sin embargo se ha demostrado mediante diferentes técnicas que estas proteínas se expresan también en amastigotes, aunque sus características varían ligeramente entre una etapa y la otra (10). En ambos casos se encuentran ancladas a la membrana mediante

su unión a la estructura Glicosilfosfatidil-Inositol (GPI). La función de estas proteínas es todavía desconocida.

Las proteínas homólogas a la gp46/M2 y el complejo PSA-2 constituyen buenas candidatas para la producción de vacunas que protejan contra la leishmaniasis. La gp46 ha sido ensayada en ratones tanto en condiciones nativas (11) como incluida en virus vaccinia recombinantes (12), demostrando en ambos casos su eficacia frente a la infección por *L. amazonensis*. El antígeno PSA-2 ha sido ensayado en condiciones nativas (13) mostrando también capacidad protectora frente a *L. major*.

Debido al gran interés que ha generado el hecho de que tanto la gp46/M2 como la PSA-2 protejan contra la enfermedad así como al hecho de que la leishmaniasis visceral causada por *Leishmania infantum* comienza a ser un grave problema sanitario en la cuenca mediterránea, resulta de gran importancia obtener el antígeno de superficie equivalente en esta especie. Nuestro laboratorio ha procedido a clonar y caracterizar el antígeno de *L. infantum* homólogo a los dos descritos, al que se ha denominado antígeno PSA. El análisis de su ubicación en el genoma ha revelado la presencia de múltiples copias del gen dispuestas en tandem, con una unidad de repetición de un tamaño aproximado de 6Kb. La proteína PSA de *L. infantum* está formada por 510 aminoácidos que le confieren una masa molecular de 54,9 kDa. Aproximadamente el 60 % de la molécula está formada por 13 elementos repetidos cuya longitud varía entre 24 y 25 aminoácidos, lo cual contrasta con la presencia de tan sólo 3 elementos homólogos en la PSA-2 y gp46/M2. La secuencia consenso obtenida a partir de estos elementos concuerda perfectamente con el consenso descrito para los motivos repetidos ricos en leucinas, lo que permite incluir tanto a la PSA de *L. infantum* como a sus proteínas homólogas en *L. major* y *L. amazonensis* dentro de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas. El motivo queda definido por la secuencia .L..L.L..N±.a..±a++++a±±.±±, en la que «a» indica la presencia de un aminoácido alifático, el punto indica cualquier aminoácido y ± indica posibles deleciones (14) (Fig 1). Las leucinas del consenso pueden ser reemplazadas a menudo por otros residuos alifáticos y la asparagina en muchas ocasiones es sustituida por una cisteína o una treonina. La longitud de los motivos puede variar considerablemente aunque la mayoría oscilan entre 20 y 29 residuos. Normalmente existen varios motivos repetidos en tandem.

La familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas, cuyo primer integrante fue descubierto hace aproximadamente 10 años, incluye hasta el momento unos 60 miembros distintos con funciones muy variadas: transducción de señal, adhesión celular, desarrollo embrionario, reparación del DNA, resistencia a patógenos en plantas y factores de virulencia. En todos los casos estas proteínas parecen estar implicadas en procesos de unión a otras proteínas. Los miembros de esta familia se encuentran presentes a lo largo de toda

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Consensus	L	L	L	L	L	L	L	L	T/N/C	T/N/C	±	±	a	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G
Leishmania	L	L	L	L	L	L	L	L	T/N/C	T/N/C	±	±	a	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G	S/T	G
FSH Receptor (Rat)	L	L	L	L	L	L	a	S	T	T	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	M
p34 Ribosome binding prot	L	L	L	L	L	L	D	L	N	N	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	a
Carboxipeptidase N (Hum)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	L
Platelet GPV (num)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	L
Platelet GP Ibc (hum)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	L
Yop M (Yersinia pestis)	L	L	L	L	L	L	a	S	N	N	-	-	-	-	-	L	P	P	P	P	P	P	P	P	-
Flightless (Drosophila)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	a	P	P	P	P	P	P	P	P	L
Toll (Drosophila)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Sit1 (Drosophila)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Connectin (Drosophila)	L	L	L	L	L	L	L	N	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Chaoptin (Drosophila)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Internalin (Listeria monocitogenes)	N	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	a	P	P	P	P	P	P	P	P	T
InlB (Listeria monocitogenes)	L	L	L	L	L	L	L	L	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Gene N (Nicotiana tabacum)	L	L	L	L	L	L	L	L	T/N/C	T/N/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L
Polygalacturonase inhibitor (pyrus comunis)	L	L	L	L	L	L	L	L	T/N	T/N	±	±	L	S/T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a

a= A, V, L, Y, F, Y or M

Fig 1.—Comparación entre secuencias consenso correspondientes a los motivos con repeticiones ricas en leucinas de diversas proteínas. La secuencia consenso del motivo rico en leucinas del antígeno PSA de *Leishmania infantum* y las proteínas homólogas GP46/M2 de *L. amazonensis* y PSA-2 de *L. major* se compara con los motivos presentes en otras proteínas dentro de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas. El consenso dado por Kobe y Deishenhofer (18) se indica en la parte superior de la figura. 'a' representa Ala, Val, Ileu, Phe, Tyr o Met. En la figura se incluyen varias proteínas de la familia con objeto de ilustrar el hecho de que proteínas distantes desde el punto de vista evolutivo comparten residuos adicionales a los incluidos en la secuencia consenso.

la escala evolutiva desde bacterias hasta mamíferos superiores como el hombre. El considerable tamaño que presentan estos motivos repetidos hace improbable que hayan podido surgir varias veces de forma independiente a lo largo de la evolución, por lo que se supone que todos estos elementos comparten un antecesor común único. De todas las proteínas con repeticiones ricas en leucina descritas hasta el momento tan sólo el inhibidor de la ribonucleasa porcina ha podido ser cristalizado. El análisis de su estructura tridimensional revela que éste se dispone en forma de herradura, no adoptando por tanto una estructura globular (15) (Fig. 2). En cada motivo repetido de la proteína se genera una hélice á que se expone en la superficie convexa de la molécula y una cadena â localizada en el interior, es decir, en la cara cóncava. Esta disposición en la que una lámina â queda expuesta al solvente constituye una conformación extremadamente inusual que probablemente es relevante en el proceso de interacción con otras proteínas.

Algunos ejemplos notables de proteínas con repeticiones ricas en leucinas son los proteoglicanos fibromodulina, decorina, lumincan, proteoglican-Lb y factor osteoinductivo que forman parte de la matriz extracelular del tejido conjuntivo y que en muchos casos se asocian a otras proteínas de la matriz. Son interesantes también algunos factores de virulencia de bacterias como Yop M en *Yersinia pestis* y IpaH en *Shigella flexneri*. En estos casos, estas proteínas con motivos repetidos ricos en leucinas actúan facilitando el proceso de infección probablemente a través de su interferencia con la respuesta inflamatoria mediada por plaquetas. Especialmente interesante es el caso de la internalina de *Listeria monocitogenes* (16). Esta proteína se encuentra directamente implicada en el proceso de unión y entrada de la bacteria a células epiteliales, habiendo sido demostrado que mutantes deficientes en internalina no son capaces de infectar. En este mismo sentido, se ha mostrado que la especie no invasiva *Listeria innocua* adquiere la capacidad de penetrar al interior de células epiteliales cuando es transformada con el gen que codifica la internalina. Recientemente se ha puesto de manifiesto que la proteína de adhesión E-Cadherina es el ligando de la internalina en las células epiteliales (17). La E-Cadherina realiza uniones homofílicas entre dos células epiteliales adyacentes por lo que se propone que la internalina, además de utilizar este ligando para el proceso de unión e internalización celular, puede competir con las uniones homofílicas entre E-Cadherinas de células contiguas y desestabilizar así las uniones celulares permitiendo la migración de la bacteria a través de los epitelios.

Como se ha indicado, la función del antígeno PSA en el parásito *Leishmania* es desconocida. Sin embargo, el análisis de las funciones de diversas proteínas pertenecientes a la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucinas permite suponer que con una gran probabilidad esta proteína va a realizar su función a través de su interacción con otras proteínas. En este sentido, podría

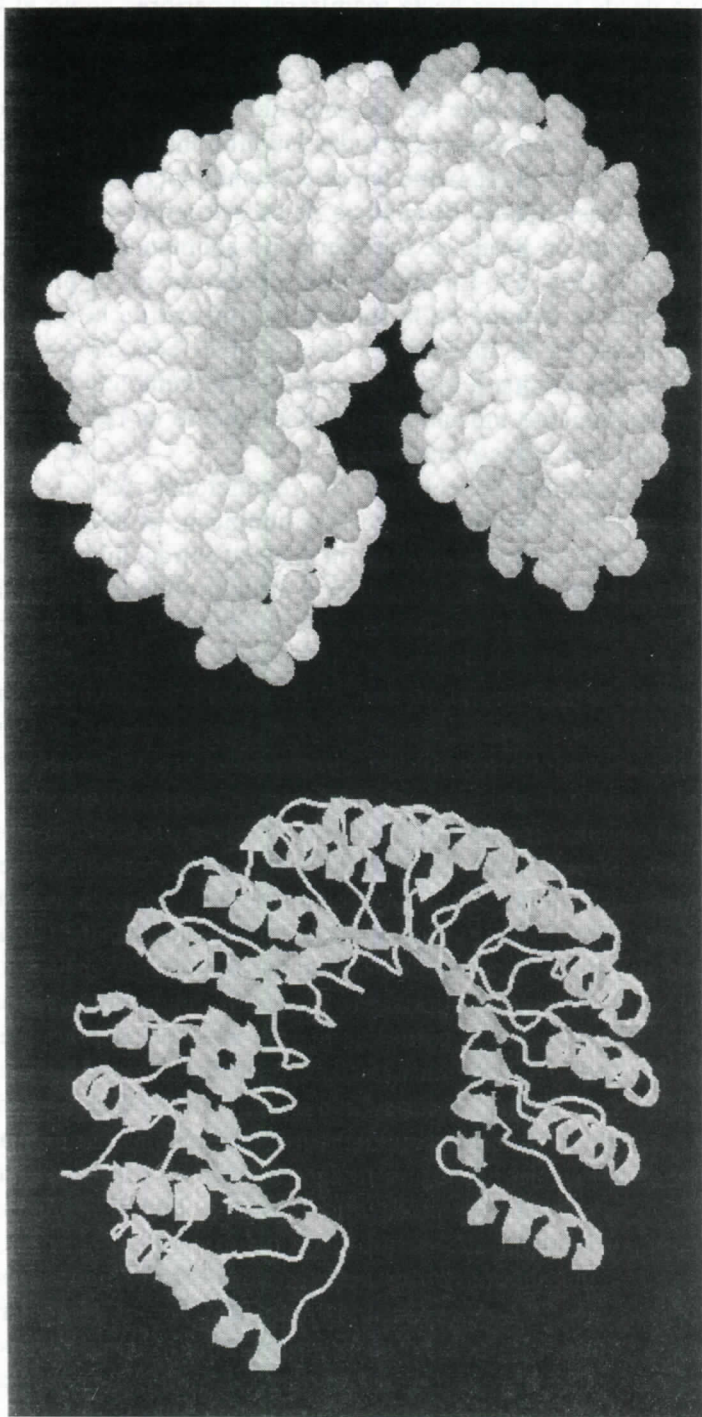


Fig 2.—Estructura del inhibidor de ribonucleasa. Diagramas de la estructura del inhibidor de ribonucleasa obtenida mediante el programa RASMOL a partir de las coordenadas obtenidas del análisis por difracción de rayos X. La figura izquierda muestra un esquema de la estructura de la proteína en la que las cintas terminadas en punta de flecha representan cadenas α y las cintas enrolladas en hélice representan hélices α . La figura de la derecha es un modelo de bolas en el que se muestran todos los átomos de la proteína.

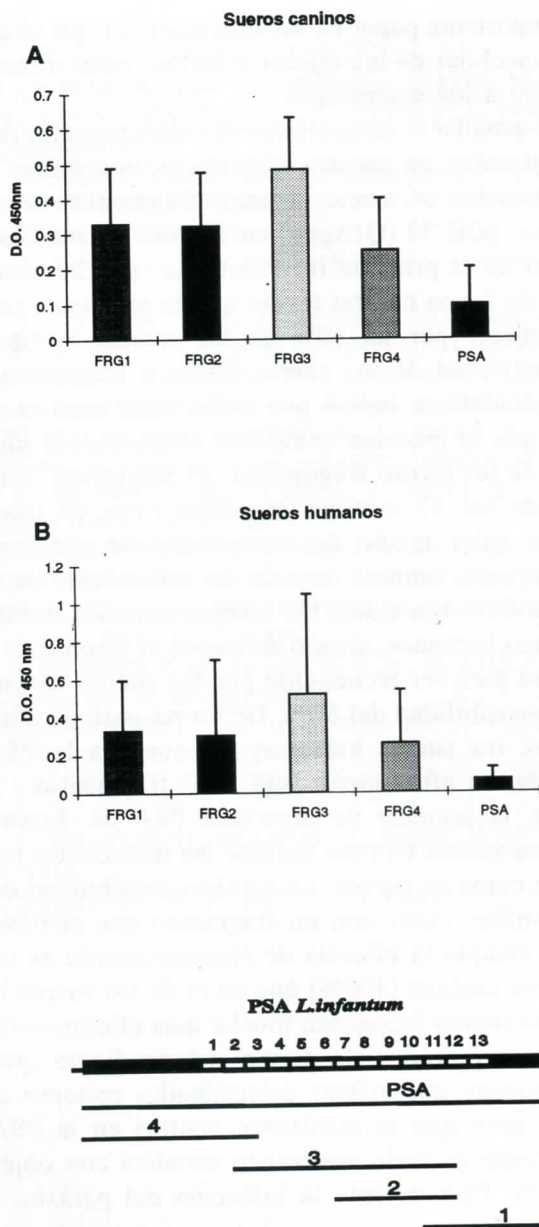


Fig 3.—Análisis de la antigenicidad de la proteína PSA recombinante completa y los fragmentos de ella expresados de forma independiente. A.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en los ensayos de Elisa de 20 sueros procedentes de perros infectados por *Leishmania infantum*. B.- Valores medios de densidad óptica obtenidos en los ensayos de Elisa de 15 sueros procedentes de pacientes humanos con leishmaniasis. En la parte inferior se muestra un esquema de la proteína y los diversos fragmentos en el que las cajas abiertas representan cada una de las repeticiones.

desempeñar un importante papel en las interacciones que el parásito mantiene con la matriz extracelular de los tejidos e incluso estar directamente implicada en la asociación a los macrófagos.

Con objeto de estudiar el comportamiento inmunogénico de la PSA durante las infecciones naturales, en nuestro laboratorio procedimos a sobre-expresar y purificar esta proteína así como diversos fragmentos de ella utilizando el vector de expresión pQE 30 (QIAGEN) en *E. coli*. El análisis de la capacidad de reconocimiento de la proteína recombinante por 20 sueros obtenidos de perros infectados de forma natural reveló que la proteína completa es reconocida significativamente por un 30% de los sueros. Sorprendentemente, el análisis de la reactividad de los sueros frente a fragmentos de la proteína expresados individualmente indicó que todos ellos eran reconocidos mucho más eficazmente que la proteína completa, alcanzándose un reconocimiento del 100% en tres de los cuatro fragmentos. El fragmento 3, formado exclusivamente por 11 de los 13 motivos repetidos ricos en leucinas, es el que presenta el mayor valor medio de reconocimiento por los sueros, lo que sugiere que la respuesta inmune durante las infecciones se dirige principalmente hacia los motivos repetidos. Un comportamiento similar se observó en el ensayo con sueros humanos, siendo de nuevo el fragmento 3 el que mostró la mayor capacidad para ser reconocido por los sueros, alcanzándose en este caso tan sólo una sensibilidad del 50%. De forma análoga a lo que ocurre con los sueros caninos, los sueros humanos reconocen a la PSA recombinante completa mucho menos eficazmente que a los fragmentos.

En conclusión, la proteína de superficie PSA de *Leishmania infantum* genera una fuerte respuesta inmune durante las infecciones naturales tanto en pacientes humanos como en perros. La máxima sensibilidad de reconocimiento se alcanza en ambos casos con un fragmento que contiene 11 de los 13 motivos repetidos aunque la eficacia de reconocimiento es mucho mayor en el caso de los sueros caninos (100%) que en el de los sueros humanos (50%). En ambos casos los sueros reconocen mucho más eficazmente a los fragmentos de la proteína expresados de forma independiente que a la proteína completa, lo que sugiere que existen determinados epítomos que se muestran en los fragmentos pero que se mantienen ocultos en la PSA recombinante completa. Actualmente se están realizando estudios con objeto de definir la función del antígeno PSA durante la infección del parásito e identificar su posible ligando.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LEWIS, D. H., PETERS, W.: *Ann Trop Med Parasit* (1977), **71**:295-312.
- (2) COLOMER-GOULD, V., QUINTAO, L. G., KEITHLY, J., NOGUEIRA, N.: *J Exp Med* (1985), **162**:902-916.
- (3) TURCO, S. J., DESCOTEAUX, A.: *Ann Rev Microbiol* (1992), **46**:65-94.
- (4) JARDIM, A., HANSON, S., MCCUBBIN, B. U. W. D., KAY, C. M., OLAFSON, R. W.: *Biochem J* (1995), **305**:315-320.
- (5) MURRAY, P. J., SPITHILL, T. W., HANDMAN, E.: *J Immunol* (1989), **143**:4221-4226.
- (6) MURRAY, P. J., SPITHILL, T. W.: *J Biol Chem* (1991), **266**:24477-24484.
- (7) SYMONS, F. M., MURRAY, P. J., JI, H., SIMPSON, R. J., OSBORN, A. H., CAPPAL, R., HANDMAN, E.: *Mol Biochem Parasitol* (1994), **67**:103-113.
- (8) KAHL, L. P., MCMAHON-PRATT, D.: *J Immunol* (1987), **138**:1587-1595.
- (9) MCMAHON-PRATT, D., TRAUB-CSEKO, Y., LOHMAN, K. L., ROGERS, D. D., BEVERLEY, S. M.: *Mol Biochem Parasitol* (1992), **50**:151-160.
- (10) HANDMAN, E., OSBORN, A. H., SYMONS, F., DRIEL, R. V., CAPPAL, R.: *Mol Biochem Parasitol* (1995), **74**:189-200.
- (11) CHAMPSI, J., MCMAHON-PRATT, D.: *Infect Immun*, (1988), **56**:3272-3279.
- (12) MCMAHON-PRATT, D., RODRÍGUEZ, D., RODRÍGUEZ, J. R., ZHANG, Y., MANSON, K., BERGMAN, C., RIVAS, L., RODRÍGUEZ, J. F., LOHMAN, K. L., YAL, N. H. R. E.: *Infect Immun* (1993), **61**:3351-3359.
- (13) HANDMAN, E., SYMONS, F. M., BALDWIN, T. M., CURTIS, J. M., SCHEERLINCK, J. P.: *Infect Immun*, (1995), **63**:4261-4267.
- (14) KOBE, B., DEISENHOFER, J.: *Curr Opin Struct Biol* (1995), **5**:409-416.
- (15) KOBE, B., DEISENHOFER, J.: *Nature* (1993), **366**:751-6.
- (16) GAILLARD, J. L., BERCHE, P., FREHEL, C., GOUIN, E., COSSART, P.: *Cell* (1991), **65**:1127-41.
- (17) MENGAUD, J., OHAYON, H., GOUNON, P., MEGE, R.-M., COSSART, P.: *Cell* (1996), **84**:923-932.
- (18) KOBE, B. J., DEISENHOFER, J.: *TIBS* (1994), **19**:415-421.