

# PAPEL DE LYT1 EN EL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi*

Manning-Cela R

Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D.F.

Palabras clave: Lisis, infectividad, parásitos, diferenciación, *Knock-out*.

Correspondencia: Departamento de Biomedicina Molecular. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado 14-740, México, DF 07360, México. Tel: 52 555061-3322, Fax: 52 555747-7134, Email: rmanning@mail.cinvestav.mx

---

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo parásito de importancia médica y biológica. Es miembro de la familia *Trypanosomatidae* del orden *Kinetoplastida*, en donde además se agrupan otros parásitos patógenos de mamíferos como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*. Estas tres especies juntas son responsables de enfermedades que afectan a más de los 200 millones de personas de manera directa, y a un número aún mayor a través del impacto económico que éstos y otros parásitos relacionados, producen al afectar a animales de importancia económica. *T. cruzi*, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la cual afecta a más de 20 millones de personas en Sur y Centro América. En México, en los últimos años se han reportado alrededor de 300 casos de infección por *T. cruzi*. Sin embargo, el número de infectados podría ser mucho mayor, pues estudios seroepidemiológicos llevados a cabo en Oaxaca, Morelos, Puebla, Guerrero y Jalisco han revelado que en algunas zonas de dichos estados se presentan porcentajes de positividad de entre el 20% y el 60% (Velasco, 1991; Sánchez-Hernández, 1996).

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida bifásico, el cual incluye cuatro estadios de desarrollo diferentes, dos en insectos hemípteros de la familia *Reduviid* y dos en el hospedero mamífero. En el insecto la forma flagelada del parásito llamado epimastigote, prolifera en la parte media del intestino antes de diferenciarse en tripomastigote metacíclico (forma infectiva y no replicativa del parásito) en el recto del insecto. Después de introducirse en la sangre del huésped el parásito infecta las células de éste, diferenciándose en amastigote e iniciando

nuevamente su replicación. Finalmente el amastigote se desarrolla en tripomastigote procíclico o de forma sanguínea, el cual puede o bien iniciar un nuevo ciclo de infección al infectar células vecinas o ser tomado nuevamente por el insecto durante la ingesta sanguínea transformarse nuevamente en epimastigote en el intestino de éste y completando así su ciclo de vida (Brenner, 1973; Dvorak, 1975).

La invasión de la célula huésped por *T. cruzi* es un evento complejo que parece involucrar diversas etapas, iniciando con la unión del parásito a la célula huésped. Inmediatamente después de la unión pero probablemente antes de la internación del parásito, los lisosomas de la célula huésped se agrupan en el sitio de unión. Posteriormente en una serie de rápidos eventos el parásito es internado concomitantemente con la fusión de los lisosomas reclutados y la membrana plasmática de la célula, resultando en la formación de la vacuola parasitófora (Rodríguez *et al*, 1996; Tardieux, 1992). Finalmente la vacuola parasitófora es lisada y los amastigotes liberados se multiplican libremente en el citoplasma. Aún cuando la maquinaria de la célula huésped involucrada en la internación del parásito es razonablemente bien conocida, muy poco se conoce acerca de las moléculas del parásito involucradas en este proceso.

Un factor del parásito probablemente involucrado en el proceso de infección del parásito fue identificado originalmente como una actividad hemolítica estable en condiciones ácidas llamada TC-TOX. Aun cuando se expresa en todas las etapas del parásito, TC-TOX se encuentra mayoritariamente en tripomastigotes que es la forma infectiva del parásito así como en amastigotes, sugiriendo que la actividad lítica

podría jugar algún papel importante durante la infección (Andrews, 1990; Andrews *et al*, 1989 y 1990). Además de su estabilidad en medio ácido, propiedad que concuerda con las condiciones ácidas de la vacuola parasitófora, TC-TOX tiene características que sugieren se relaciona con el componente C9 del complemento ya que ambas presentan el mismo peso molecular de 75Kd y tienen reacción cruzada con anticuerpos dirigidos contra C9 (Andrews *et al*, 1990). Desafortunadamente, la inestabilidad *in vitro* de TC-TOX no ha permitido determinar su secuencia de aminoácidos ni ha sido clonado su gen, siendo hasta ahora poco el progreso en la determinación de la función de esta proteína.

Una segunda proteína que se ha mostrado tiene un papel importante en la invasión celular, es la oligopeptidasa B (Burleigh *et al*, 1997; Caler *et al*, 1998). Esta proteína es codificada por un gen único cuyo producto está involucrado en la activación de la cascada de señalización de la célula huésped requerida durante la infección del parásito. El doble reemplazo del gen (doble *Knock-out*) mostró una disminución significativa en la infectividad comparado con los parásitos silvestres, además el reemplazo sencillo del gen (*Knock-out* sencillo) resultó en un fenotipo intermedio sugiriendo fuertemente que la oligopeptidasa B juega un papel importante en la infección. El análisis bioquímico de los parásitos mutantes mostró que la Oligopeptidasa B participa en la formación de un agonista importante en la señalización del Ca<sup>2+</sup> de la célula huésped requerido en la entrada del parásito.

La última molécula reportada hasta la fecha en que evidencias genéticas demuestran su participación en el proceso de infección es LYTI (Manning-Cela *et al* 2001). El presente trabajo resume el estudio de esta molécula realizado hasta la fecha por nuestro grupo. Utilizando una estrategia genética demostramos que LYTI esta involucrada en el proceso de infección de *T. cruzi*. LYTI se clonó de una biblioteca de expresión de *T. cruzi* cepa Y, basándose en su reacción cruzada con un anticuerpo dirigido al componente C9 del complejo de ataque a la membrana del complemento. Posteriormente, usando la secuencia de cDNA de LYTI como sonda molecular, se obtuvo la clona genómica correspondiente de la cepa Y la cual incluyó la secuencia completa que codifica para LYTI así como las regiones flanqueantes 3' y 5'. Ensayos tipo *Southern blot* indicaron que LYTI

corresponde a un gene de copia única de 1656 bp que codifica para una proteína de 552 aminoácidos (LYTIp). El análisis de secuencia mostró que LYTIp no tiene homología significativa con C9 sugiriendo que la reacción cruzada observada, pudo ser resultado de la presencia de epítopes conformacionales comunes de las dos proteínas. La búsqueda en la base de datos de DNA y proteínas también falló para encontrar homología significativa con proteínas conocidas o productos potenciales de traducción. La única homología encontrada fue de los aminoácidos 5 al 13 que corresponde a una posible secuencia señal. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de una clona genómica conteniendo la secuencia que codifica para LYTIp y sus regiones flanqueantes 3' y 5' de la cepa CI-Brener, realizando el análisis genético obteniendo y caracterizando parásitos *Knock-out* carentes de un alelo o los dos alelos de LYTI a fin de determinar la(s) posible(s) función(es) del producto del gen LYTI. Basándonos en la secuencia nucleotídica del alelo LYTIa se construyeron dos plásmidos conteniendo el gen neo<sup>r</sup> o Hyg<sup>r</sup> que confieren la resistencia a G418 e hygromicina respectivamente unidos a las secuencias flanqueantes 5' y 3' de LYTIa, para llevar a cabo el reemplazo de los alelos de LYTI. Por análisis de *Southern blot* encontramos varias clonas que presentaban el reemplazo único del alelo LYTIa, dos clonas con el reemplazo de ambos alelos y una clona adicional que mantuvo ambos alelos nativos además de contener una secuencia LYTI adicional (L13). El análisis de *Northern blot* mostró una banda de 1.8 Kb en la cepa silvestre y *Knock-out* sencillo (L14). Como se esperaba no se encontró hibridación con el RNA del doble *Knock-out* (L16). Aún cuando el *Northern blot* no se considera cuantitativo, la hibridación del RNA de L14 es menos intensa que la obtenida con el RNA de los parásitos silvestres siendo consistente este resultado con el hecho de que L14 contiene y expresa un solo alelo de LYTI.

Usando metodologías genéticas mostramos que LYTI no es esencial en epimastigotes, sin embargo parásitos deficientes en LYTI mostraron tres fenotipos sobresalientes (Tabla I) (Manning-Cela *et al* 2001):

Primero, la habilidad de las líneas mutantes para completar una infección eficiente *in vitro*, se redujo de un 90 a 95% con respecto a

TABLA I

CEPA	% INFECTIVIDAD	% CONVERSIÓN DE ESTADIO		% ACTIVIDAD HEMOLÍTICA EN CONDICIONES ACIDAS	
		A	T	A	E
WT	100	5	3	100	100
L-14	12	68	32	41	84
L-16	2	65	18	36	58

A= Amastigotes, T= Tripomastigotes, E= Epimastigotes.

la cepa silvestre. El promedio de cuatro experimentos independientes mostró que en el momento en que los parásitos silvestres alcanzan 100% de eficiencia de infección, las líneas mutantes muestran aproximadamente 12% (L14, sencillo *Knock-out*) y 2% (L16, doble *Knock-out*), sugiriendo que LYTIp (producto de LYTI) juega un papel importante durante la infección ya que en su ausencia la infección está seriamente comprometida. Para aportar pruebas adicionales, se realizó el experimento de reconstitución en el que se introdujo de manera transitoria el alelo *LYTIa* a la línea L16 (doble *Knock-out*). Los resultados mostraron que la secuencia *LYTI* exógena fue capaz de reconstituir el fenotipo de infectividad a los mismos niveles que los parásitos silvestres. Este resultado junto con el efecto de dosis observado en el fenotipo de infectividad de los parásitos L14 y L16 sugiere fuertemente que el LYTIp juega un papel importante durante el proceso de infección. Experimentos de inmunolocalización utilizando anticuerpos dirigidos contra amastigotes y contra lisosomas así como tinción con DAPI, mostraron que durante la infección de células huésped los parásitos mutantes retrasaron notablemente su salida de la vacuola parasitófora al citoplasma de la célula huésped (80% parásitos en vacuola/20% en citoplasma en L16 a 6 horas post-infección) comparado con los parásitos silvestres (9% parásitos en vacuola/91% en citoplasma en WT a 6 horas post-infección). Estos resultados sugieren que LYTIp probablemente participa en el mecanismo que usa el parásito para lisar la vacuola parasitófora. El hecho de que L16 muestre bajos pero detectables niveles de infección y habilidad para escapar de la vacuola parasitófora sugiere dos posibilidades: 1) hay un mecanismo de infección independiente de LYTIp o 2) LYTIp es parte de un complejo proteico que en su ausencia el resto del complejo es capaz de presentar suficiente actividad para mantener esos bajos niveles de

infectividad. Esta última posibilidad es apoyada por los resultados obtenidos durante la caracterización de L-13 (clona que mantuvo ambos alelos nativos además de contener una secuencia *LYTI* adicional) cuyo fenotipo es similar al observado en el doble *Knock-out* lo que es consistente con una posible mutante dominante negativa, sugiriendo que LYTI posiblemente es parte de un complejo proteico (L16) (Manning-Cela y Swindle 2003).

Segundo, ya que una infectividad reducida de los parásitos mutantes podría ser un efecto indirecto de la inhabilidad del parásito para completar su ciclo de vida, analizamos si la mutación en *LYTI* pudo afectar la eficiencia de transición del parásito a través de los diferentes estadios de desarrollo. Los resultados mostraron que la habilidad de los epimastigotes deficientes en *LYTI*, para transformarse tanto a amastigotes como a tripomastigotes metacíclicos *in vitro* se incrementó en aproximadamente 15 y 10 veces más respectivamente con respecto a los parásitos silvestres, indicando que la infectividad reducida observada es un efecto directo a la ausencia de *LYTI*. Además, este fenotipo sugiere que la expresión de *LYTI* de algún modo reprime la transición de estadio de los epimastigotes. Sugiriendo que la inhibición de la expresión de *LYTI*, tanto a través de un proceso normal o de mutación, podría liberar esa supresión permitiendo la expresión de proteínas específicas de amastigotes o tripomastigotes metacíclicos dependiendo de las condiciones de cultivo.

Tercero, ya que el gene *LYTI* sé clonó originalmente en base a su reacción cruzada con anticuerpos anti-C9 consideramos importante analizar el efecto de la deficiencia de *LYTI* en la actividad lítica del parásito. Levaduras que expresan LYTIp como péptido de fusión presentaron 20% mas actividad hemolítica en condiciones ácidas que los controles. Por otro lado tanto en amastigotes como en epimastigotes de cada línea mutante expresó

menos actividad hemolítica en condiciones ácidas comparado con los parásitos silvestres. En amastigotes la actividad hemolítica en condiciones ácidas disminuyó 2.4 en L14 y 2.7 veces en L16 comparado con los amastigotes silvestres. En epimastigotes la actividad hemolítica en condiciones ácidas disminuyó 0.8 veces en L14 y 1.6 veces en L16 comparado con los epimastigotes silvestres.

Los tres fenotipos asociados con la deficiencia de *LYTI* de algún modo parecen ser contradictorio. Los parásitos mutantes son deficientes para una actividad hemolítica, lo cual es consistente con una infectividad disminuida, características que pudieran ser explicadas si LYTIp fuese una proteína que se secreta. Sin embargo exhiben también una transición de estadio acelerada, que aparentemente pareciera inconsistente con la disminución en la infectividad y cuya explicación solo es posible si pensamos que LYTIp es una proteína citoplásmica o nuclear. Una explicación simple de esto pudiera ser que en ausencia de una actividad lítica una transición de estadio acelerada no tiene un efecto en la infección. Ya que genéticamente no hemos sido capaces de separar los fenotipos de transición de estadio y de hemólisis no podemos contestar esta pregunta con los datos hasta ahora disponibles. Otra posibilidad sería que LYTI tuviera un efecto inicial sobre diversas moléculas con diferente función. Y finalmente la posibilidad de que LYTIp pudieran ser producidas tanto en una forma citoplásmica o nuclear como ser secretada.

Esta última posibilidad fue factible cuando realizamos el análisis de secuencia codificante y flanqueante de *LYTI* la cual muestra un sitio de inicio de traducción en el codón ATG en la posición +1 el cual debería producir la proteína completa incluyendo los primeros 29 aa dentro de los cuales se encuentran los nucleótidos con homología a una posible secuencia señal. Sin embargo, basándonos en los conocimientos de

los elementos de secuencias *cis-acting* involucrados en el *trans-splicing* (fragmento de poli pirimidinas de los nucleótidos -25 a -49, y probable sitio de ramificación en la posición -51), y el uso de mecanismos de rastreo para la elección del sitio aceptor 3' del *splicing* (Hummel *et al*, 2000), el *trans-splicing* podría suceder en la posición +10. En este caso la traducción de este RNAm estaría en fase al codón ATG que está en posición +85 y que producirá un péptido carente de los primeros 29 a.a. de la proteína completa (Figura 1). Esta posibilidad podría afectar profundamente la función de LYTIp ya que en un caso produciría la proteína completa con la posible secuencia señal en el amino-terminal, lo que podría llevar a la proteína a ser secretada (LYTIps) y en el otro sin la posible secuencia señal produciendo una forma citoplásmica o nuclear de LYTIp (LYTIpc). Esta posibilidad se demostró por experimentos de extensión 5' y RT-PCR, que mostraron la producción de tres transcritos diferentes que corresponden a ambas formas de la proteína. El análisis de secuencia de las tres diferentes clonas obtenidas mostraron que el sitio de unión del mini-exón fue en las posiciones -48 y -14 de la región ínter génica de *LYTI* y +10 dentro del marco de lectura abierto de *LYTI*. Consecuentemente es posible que tanto una forma citoplásmica o nuclear (LYTIpc) como una forma secretada de la proteína (LYTIps) se estén expresando. El transcrito que sufrió el *trans-splicing* en la posición -14 fue inesperado ya que la región ínter génica queda arriba de ambos alelos de *LYTI* no presentan el sitio aceptor (AG) consenso del *splicing* en esta posición siendo esta la primera vez que se reportó el uso de un sitio inusual del *trans-splicing* (Manning-Cela *et al*, 2002). El análisis cuantitativo de los tres transcritos alternativos de *LYTI* mostró que estos se expresan diferencialmente en los diferentes estadios de desarrollo del parásito

```
CTTCGCAACTTGCCTTTTGGTCTCTGCCTTGTTGAAGTTTCCCCTCCTTTCTTTTTTTTTTTGGTTTGGTGGCCCGTGC
TCGCTCTCATGCGAAGAAAGCCGCAGCATTAGCAGCGCCCACAGCAGACACCGCCGACGTGCCGCGGG
GCTGCCATTGCCAATAAATTTATGGAACGTGCCGCCCCCGTG
```

Figura 1.- Análisis de la secuencia flanqueante 5' y parte de la secuencia codificante del alelo *LYTI*a de la cepa CL Brenner. Los codones de inicio de la traducción de la posición +1 y +85 se muestran subrayados. Los tres sitios aceptores 3' del *splicing* se muestran en negrillas. Los posibles trectos de poli pirimidinas están en *italicas*.

expresándose mayoritariamente en el estadio de amastigote. Además, la forma posiblemente secretada de la proteína se encuentra en mayor abundancia en tripomastigotes y amastigotes cuando se compara con respecto a la posible forma citoplásmica o nuclear (Manning-Cela et al, 2002).

La producción de los tres transcritos de *LYTI*, dos que codifican para la forma completa de la proteína conteniendo la posible secuencia señal amino terminal y otra que codifica para la forma truncada de la proteína carente de la posible secuencia señal, es consistente con la posibilidad de producir tanto una forma citoplásmica o nuclear como una forma secretada de la proteína. Si esto así fuera, sería posible la compartimentalización diferencial de *LYTI* pudiendo explicar su participación en procesos biológicos tan diversos como la hemólisis, infección y regulación de estadio. Estudios dirigidos en este sentido se encuentran en desarrollo en mi grupo de trabajo.

Ya que *LYTI* es secretada por el parásito de manera temprana durante el proceso de infección de la célula huésped es posible que ésta sea accesible a ser presentada en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, colocándola como una molécula candidato a ser utilizada como vacuna génica. Esta posibilidad fue abordada recientemente por el grupo del Dr. Tarleton, quienes encontraron que *LYTI* indujo una respuesta protectora a la infección de *T. cruzi* en un modelo murino. El nivel de protección generado por la vacunación con *LYTI* fue comparable al obtenido con la vacunación utilizando un grupo de trans-sialidasas (Fralish y Tarleton, 2003).

### **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado en parte con el apoyo de CONACYT-México (34877-N) otorgado a R. M-C.

### **Referencias bibliográficas**

Andrews, N. A., and M. B. Whitlow. 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin at low pH. *Molecular and Biochem Parasitol.* 33:249-256.

Andrews, N. W. 1990. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology.* 71:241-4.

Andrews, N. W., C. K. Abrams, S. L. Slatin, and G. Griffiths. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein

immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61:1277-87.

Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:347-383.

Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P. and Andrews, N.W. 1997. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup>-signaling in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 136:609-620.

Caler, E. V., S. Vaena de Avalos, P. A. Haynes, N. W. Andrews, and B. A. Burleigh. 1998. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 17:4975-86.

Dvorak, J.A. 1975. New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. *New approaches Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub* 318:109-120.

Fralish, B.H. and Tarleton, R.L. 2003. Genetic Immunization with *LYTI* or a pool of a trans-sialidase genes protects mice from lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21: 3070-3080.

Hummel, H. S., R. D. Gillespie, and J. S. Swindle. 2000. Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem.* 275:35522-31.

Manning-Cela, R., Cortes, A., Gonzalez-Rey, E., Van Voorhis, W.C., Swindle, J., Gonzalez, A. 2001. *LYTI* protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 69:3916-23.

Manning-Cela, R., Gonzalez, A., and Swindle, J. 2002. Alternative Trans-splicing of the *LYTI* Gene of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*70(8):4726-8.

Manning-Cela, R., y Swindle, J. 2003. Obtención y Análisis de una Mutante Dominante Negativa de *LYTI* de *Trypanosoma cruzi*. *SIICSalud*. En línea.

Rodríguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A. and Andrews, N.W. 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell Biol.*, 134: 349-362.

Sánchez-Hernández, B.E. 1996. Uso de elisa, western blot y hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos. Tesis para obtener el título de Químico-biólogo, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E. and Andrews, N.W. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for Trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 71: 1117-1130.

Velasco, O. 1991. La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE, Secretaria de Salud. México D.F. 8:56.