

# Localización de epítomos en distintos antígenos de *Leishmania infantum*. Aplicación en el desarrollo de un sistema de diagnóstico serológico

Epitope mapping of some *Leishmania infantum* antigens for their application in serodiagnostic assays

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L. y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco. 28049 Madrid.

## RESUMEN

En este trabajo se describe la caracterización de cinco proteínas antigénicas de *Leishmania infantum*, el agente etiológico de la leishmaniosis visceral canina en España. Las proteínas aisladas fueron dos histonas, la H2A y la H3, y tres proteínas ribosomales de la familia de las proteínas ácidas, la LiP2a, LiP2b y LiP0. Todas ellas se caracterizaron tras el aislamiento de los genes que las codificaban en forma de cDNAs contenidos en librerías construidas en fagos  $\phi$ gt11. El aislamiento se llevó a cabo tras rastrear las librerías con sueros obtenidos de perros infectados de forma natural por el parásito. El análisis de secuencia mostró que aunque estas proteínas en *Leishmania* poseían un carácter conservado existían regiones donde aparecían secuencias específicas para el parásito. Precisamente fue en estas regiones donde se localizaron los determinantes antigénicos de las diferentes proteínas. Con el fin de desarrollar un sistema de diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina, las regiones antigénicas de las cinco proteínas fueron expresadas y purificadas como polipéptidos recombinantes. La utilización de estos antígenos recombinantes en ensayos de ELISA demostró la potencialidad del uso de estas proteínas para el desarrollo de sistemas de diagnóstico serológico sensibles y específicos de la leishmaniosis canina.

**Palabras clave:** *Leishmania infantum*. Antígenos. Diagnóstico. Proteínas ácidas. Histonas. Péptidos.

## ABSTRACT

In this work we describe the characterization of five antigenic proteins of *Leishmania infantum*, parasite whose infection cause canine visceral leishmaniosis in Spain. The following antigenic proteins were characterized: the histones H2A and H3, and three members of the acidic ribosomal protein family, LiP2a, LiP2b and LiP0. All of them were isolated after isolation of their cDNAs by immunoscreening of a *L. infantum*  $\phi$ gt11 expression library with the sera from dogs naturally infected with the parasite. Aminoacid

sequence analysis showed that all of them were conserved relative to the eukaryotic equivalent proteins but also that they possessed divergent regions. Epitope mapping demonstrated that the antigenic determinants were always located in these specific regions of the parasite proteins. In order to develop a serodiagnosis test for canine leishmaniasis these antigenic regions were expressed and purified as independent polypeptides. The usefulness of these recombinant proteins in ELISA assays for canine leishmaniasis diagnosis has been analyzed.

**Key words:** *Leishmania infantum*. Antigens. Serodiagnostic. Acidic ribosomal proteins. Histones. Peptides.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 273-283]

Los parásitos protozoos del género *Leishmania*, son organismos unicelulares, con un ciclo de vida digenético. En su forma flagelada (promastigote) el parásito se localiza en el intestino medio del insecto vector, mosquitos hembra de la subfamilia *Phlebotominae*. La transmisión al hospedador vertebrado se produce en la picadura, durante la cual las formas metacíclicas del parásito son inyectadas al torrente sanguíneo. Una vez allí, el parásito infecta células del sistema mononuclear fagocítico donde se diferencia a su forma no flagelada (amastigote). La infección del parásito provoca un complejo de cuadros clínicos diferentes según la especie del patógeno que infecte y el vertebrado infectado, conocidos con el nombre genérico de leishmaniosis. En la Península Ibérica la especie distribuida es *L. infantum* y su infección en humanos provoca una leishmaniosis visceral, afectando principalmente a individuos inmunodeprimidos, ancianos o niños (1). La frecuencia de aparición de leishmaniosis en humanos se ha relacionado con la existencia de focos de leishmaniosis canina, existiendo una evolución paralela entre la leishmaniosis humana y canina (2-3). La infección canina provoca una leishmaniosis visceral aguda complicada con lesiones cutáneas (4), precedida de una fase asintomática detectable por la existencia de anticuerpos circulantes contra las proteínas del parásito (5) durante la cual el perro actúa como foco infeccioso (6-7).

La infección por *Leishmania* provoca una activación específica y con memoria del sistema inmune del hospedador vertebrado, activándose diferentes poblaciones celulares del sistema inmune del hospedador. La eliminación del parásito está relacionada con la activación de macrófagos infectados por linfoquinas secretadas por subpoblaciones Th1 de linfocitos T CD4+. Además, se produce una activación y proliferación de linfocitos B productores de anticuerpos contra las estructuras antigénicas de parásito (8). Precisamente, la presencia de estos anticuerpos ha permitido el desarrollo de sistemas de diagnóstico serológico para la detección de la infección. Numerosos estudios

han demostrado el alto número de antígenos existentes en extractos de proteínas totales de *Leishmania*, reconocidos por sueros de pacientes de diferentes formas de leishmaniosis (9-12). De la misma forma, se han detectado anticuerpos circulantes contra un gran número de proteínas del parásito en el suero de perros infectados por *Leishmania* bien de forma natural (5) o experimentalmente (13-15)

Durante los últimos años, se han caracterizado numerosas proteínas de *Leishmania* por su carácter antigénico e inmunogénico (Tabla 1). Un primer grupo de antígenos está constituido por proteínas situadas en la superficie celular. Entre ellas destaca la proteasa de superficie gp63, una glicoproteína reconocida por sueros de humanos (16-17) y perros (18) enfermos, capaz de inducir protección al ser inmunizada en animales de experimentación (8). Otro de los componentes de la membrana es la glicoproteína gp46, un antígeno reconocido por sueros de pacientes de diferentes formas de leishmaniosis (19), capaz de inducir protección tras ser inmunizada en animales de experimentación (20). Un tercer antígeno localizado en la membrana el parásito es la proteína KMP11, que parece encontrarse asociada al lipofosfoglicano, un glucolípido mayoritario de la membrana el parásito (21-22). Esta proteína es blanco de la respuesta inmune el hospedador vertebrado, siendo reconocida por sueros leishmaniósicos, tanto humanos como caninos (23). Un segundo grupo de antígenos está compuesto por proteínas intracelulares de naturaleza conservada. Dentro de este grupo conviene señalar a dos miembros de la familia de proteínas de choque térmico. Tanto la hsp70 como la hsp83 de *Leishmania* son reconocidas por sueros de pacientes (24-26) y de perros (27-28) infectados por el parásito. La quinesina del parásito también ha sido descrita como un antígeno dominante, observándose reactividad contra ella en sueros leishmaniósicos tanto humanos como caninos (29-30). Existen además otras proteínas antigénicas cuya naturaleza aun no ha sido caracterizada. Entre ellas se encuentra una proteína de 32 kDa (P32) localizada en la membrana de *L. infantum*, reconocida por el 95% de sueros obtenidos de pacientes de leishmaniosis visceral (31), un antígeno de 210 kDa reconocido por el suero de pacientes de leishmaniosis visceral provocada por la infección de *L. tropica* (32), y otra proteína de un tamaño superior a 200 kDa denominada Lcr1 reconocida por sueros de pacientes con leishmaniosis visceral (33). Jaffe y col. (34) caracterizaron dos proteínas, gp70-2 y dp72, de *L. donovani* que eran reconocidas por sueros de pacientes de leishmaniosis visceral. También se han localizado distintas proteínas marcadoras de la enfermedad en extractos de proteínas totales: un antígeno de 94 kDa (35) y uno de 17 kDa (12) reconocidos por sueros de humanos y perros afectados de leishmaniosis visceral, y tres proteínas de 14 kDa, 16 kDa (9) y 52 kDa (11), reconocidas por el suero de pacientes de leishmaniosis visceral.

Durante los últimos años en nuestro laboratorio se han caracterizado

		<b>Función</b>	<b>Antigenicidad</b>	<b>Inmunogenicidad</b>
<b>Proteínas ribosomales</b>	<b>LIP2a</b>	Interacción factores de traducción	VL y MCL humana VL canina	—
	<b>LIP2b</b>	Interacción factores de traducción	VL y MCL humana VL canina	—
	<b>LiP0</b>	Estructura del ribosoma Interacción factores de traducción	VL canina	—
	<b>Quinesina</b>	Transporte intracelular	VL humana VL canina	—
<b>Proteínas no caracterizadas</b>	<b>Antígeno 210 kDa</b>	<i>Leishmania tropica</i>	VL humana	—
	<b>Lcrl</b>	200 kDa	VL humana	—
	<b>Antígeno 94 kDa</b>	Banda proteica en extractos totales de diferentes especies de <i>Leishmania</i>	VL humana VL canina	—
	<b>Antígeno 14 kDa</b>	Banda proteica en extractos totales de <i>L. infantum</i>	VL humana	—
	<b>Antígeno 52 kDa</b>	Banda proteica en extractos totales de <i>L. infantum</i>	VL y CI humana	—
	<b>Antígenos 14-16kDa</b>	Bandas proteicas en extractos totales de <i>L. infantum</i>	VL humana	—

	Función	Antigenicidad	Inmunogenicidad
Proteínas de membrana	<b>Gp63</b> Modificación proteínas del complemento Interacción con el macrófago Protección enzimas hidrolíticas	VL humana VL canina	Induce resistencia a la infección
	<b>Gp46</b> Supervivencia del parásito en el insecto Protección enzimas hidrolíticas	VL, MCL y CL humana	Induce resistencia a la infección
	<b>Kmp11</b> Proteína de membrana específica de kinetoplastidos. Puede interaccionar con el LPG	VL humana VL canina	—
	<b>Gp 70-2</b> Glicoproteína de membrana <i>L. donovani</i>	VL humana	—
	<b>dp 72</b> Proteína de membrana <i>L. donovani</i>	VL humana	Induce resistencia
	<b>P32</b> Localizada en membrana de <i>L. infantum</i>	VL humana	—
Choque térmico	<b>Hsp70</b> Función chaperonina	VL humana VL canina	—
	<b>Hsp83</b> Función chaperonina	VL humana VL canina	—
Histonas	<b>H2A</b> Formación nucleosoma	VL canina	—
	<b>H3</b> Formación nucleosoma	VL canina	—

Tabla 1.—Resumen de las proteínas antigénicas de *Leishmania*. Las abreviaturas utilizadas fueron: VL, leishmaniosis visceral; MCL, leishmaniosis viscerocutánea; CL, leishmaniosis cutánea.

distintas proteínas de *L. infantum*, de acuerdo a sus características antigénicas. La estrategia seguida fue la de rastrear genotecas de cDNA construidas en el fago  $\phi$ gt11 con sueros obtenidos de perros infectados de forma natural con el parásito (la metodología empleada se describe en la referencia número 36). De esa forma se obtuvieron cDNAs que codificaban para cinco proteínas antigénicas del parásito. La caracterización de las mismas se llevó a cabo por secuenciación de los clones obtenidos, analizándose las secuencias mediante los programas desarrollados por la Universidad de Wisconsin (37). Los antígenos caracterizados fueron dos histonas, la H2A y la H3, y tres proteínas ribosomales, nombradas LiP2a, LiP2b y LiP0. Todas ellas pueden clasificarse como proteínas conservadas en estructura, lo que está correlacionado con su conservación también de función. Las histonas interaccionan entre si formando los nucleosomas organizadores de la cromatina, mientras que las proteínas ácidas intervienen en el proceso de traducción, facilitando la interacción entre factores solubles y el ribosoma. A pesar de su naturaleza conservada, estas proteínas presentan diferencias en las regiones no implicadas directamente en su función. Así, los extremos amino y carboxilo de la H2A, y el amino de la H3, regiones expuestas en el exterior del nucleosoma, presentan secuencias específicas, mientras que las regiones implicadas en la formación del nucleosoma se mantienen conservadas en ambas histonas. El análisis de la secuencia de las proteínas ácidas LiP2a, LiP2b y LiP0 indicó que las tres poseen características comunes a las proteínas ácidas de eucariotas, especialmente una gran riqueza en aminoácidos ácidos en el extremo carboxilo terminal, situándose el porcentaje de similitud en valores del 60% cuando se comparan la secuencias completas. En el caso de la LiP2a y LiP2b, la secuencia del extremo carboxilo está altamente conservada respecto a la misma región del resto de las proteínas ácidas eucariotas (38) mientras que en la LiP0 la secuencia carboxilo difiere de la consenso, asemejándose al extremo carboxilo del equivalente a la P0 en arqueobacterias (39). La variación en la secuencia carboxilo terminal de la LiP0, está reflejando la gran distancia evolutiva que presentan los kinetoplástidos respecto al resto de eucariotas.

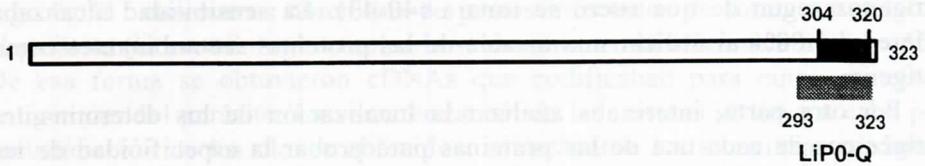
Para analizar la antigenicidad de las proteínas caracterizadas, los cinco antígenos se expresaron como proteínas recombinantes. Para ello, los cinco cDNAs aislados fueron clonados en plásmidos que permitían expresar las proteínas en ellos codificadas. El vector elegido fue el plásmido pMal-c2 (New England Biolabs) que permite la purificación de las proteínas expresadas mediante cromatografía de afinidad en columnas de amilosa, al expresarse fusionadas a una proteína de unión a maltosa (denominada MBP). Todos los antígenos fueron expresados completos, excepto la proteína LiP0 de la cual sólo se expresaron los 30 últimos aminoácidos. Para determinar el porcentaje de sueros caninos infectados que reaccionaban contra ellas, las proteínas recombinantes se utilizaron como antígenos en ensayos de ELISA. El grado

de sensibilidad obtenido para cada uno de los antígenos fue de un 70%, existiendo una enorme variabilidad en el reconocimiento de los distintos antígenos según de que suero se tratara (40-43). La sensibilidad alcanzaba valores del 80% al utilizar una mezcla de las proteínas recombinantes como antígeno.

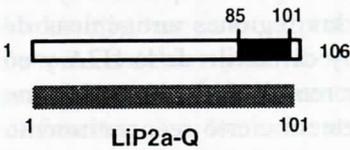
Por otra parte, interesaba analizar la localización de los determinantes antigénicos de cada una de las proteínas para probar la especificidad de las respuesta. Para ello se sintetizaron péptidos solapantes, que cubrían la secuencia de aminoácidos de las proteínas, midiéndose cuales de ellos eran reconocidos por los sueros. Los resultados obtenidos permitieron determinar que los epítomos siempre se localizaban en regiones específicas para las proteínas del parásito. Por ese motivo, nunca se observaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos generados contra las proteínas del parásito y sus equivalentes en el hospedador. Particularizando, las regiones antigénicas de las histonas se localizaron en los extremos amino y carboxilo de la H2A y en el amino de la H3, lo que eliminaba problemas de reactividades cruzadas con las histonas del hospedador. No obstante, sí se detectó cierto reconocimiento en los sueros frente a las histonas de *T. cruzi*, un parásito evolutivamente relacionado con *Leishmania* (42). En el caso de las proteínas ácidas, los anticuerpos generados contra la LiP0 reconocían el extremo carboxilo terminal, específico de *Leishmania*, sin reconocer el extremo carboxilo terminal conservado de las proteínas ácidas (41). Por otra parte, la secuencia de los determinantes antigénicos de las proteínas ácidas LiP2a y LiP2b, no incluían las regiones carboxilo terminales, estando localizadas en una zona adyacente específica de *Leishmania*. De nuevo la especificidad de los epítomos reconocidos durante la infección de *Leishmania* eliminaba reacciones cruzadas no sólo con las proteínas ácidas del hospedador, sino también con las de *T. cruzi* (40).

Los valores de sensibilidad obtenidos en el reconocimiento de los antígenos por los sueros de animales infectados, unido a la elevada especificidad de los anticuerpos generados durante la infección permitía el desarrollo de un sistema de diagnóstico para la leishmaniosis canina basado en estas cinco proteínas. Sin embargo, y con el fin de evitar problemas de reactividad cruzada se expresaron variantes de estas proteínas, carentes de las zonas conservadas. La ausencia de estas regiones elimina el riesgo del reconocimiento por anticuerpos generados contra las histonas o proteínas ácidas de otros patógenos, o auto-anticuerpos generados contra estas proteínas en el hospedador durante procesos autoinmunes. La metodología empleada fue la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de DNAs codificantes para las regiones antigénicas. Los DNAs amplificados se clonaron de nuevo en el plásmido pMal-c2 purificándose posteriormente seis polipéptidos diferentes. En la Fig. 1 se muestra un esquema de las distintas

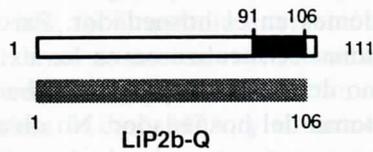
### Proteína ácida LiP0



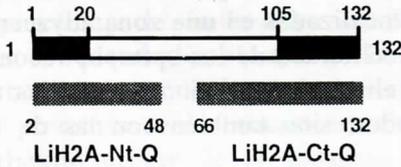
### Proteína ácida LiP2a



### Proteína ácida LiP2b



### Histona H2A LiH2A



### Histona H3 LiH3

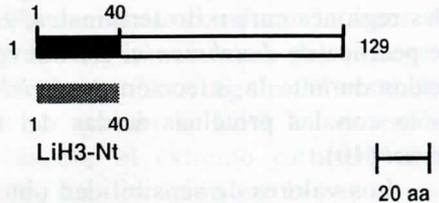


Fig. 1.—Esquema de las proteínas antigénicas de *L. infantum*. Los rectángulos blancos representan las proteínas completas, con su tamaño indicado en aminoácidos. Los rectángulos negros indican la localización de los determinantes antigénicos reconocidos por los sueros de leishmaniosis canina. Los rectángulos grises esquematizan los polipéptidos recombinantes expresados sin las regiones conservadas de las proteínas.

proteínas, las regiones que contienen los determinantes antigénicos y los nuevos polipéptidos codificados por los DNAs amplificados. El primero de ellos, denominado LiP0-Ct-Q estaba constituido por los 30 aminoácidos carboxilo-terminales de la proteína P0. En este caso no se modificó el clon de cDNA descrito anteriormente al contener únicamente regiones específicas de la P0 del parásito. Las dos proteínas ácidas restantes, denominadas ahora LiP2a-Q

y LiP2b-Q, se expresaron sin los cinco últimos aminoácidos, eliminándose así el extremo carboxilo terminal conservado. Las secuencias específicas de las dos histonas se expresaron sin las regiones conservadas; 30 aminoácidos del extremo amino de la histona H3 (LiH3-Nt-Q) y dos fragmentos de la histona H2A denominados LiH2A-Nt-Q (aminoácidos 1-48) y LiH2A-Ct-Q (66-132).

El valor diagnóstico de los seis polipéptidos purificados se probó midiendo la reactividad de los sueros en ensayos de ELISA utilizando mezclas de los mismos para antigenar. La sensibilidad del ensayo alcanzó valores del 80%, porcentajes similares a los obtenidos cuando se utilizaron mezclas de los antígenos completos. Este resultado indicaba que la eliminación de las zonas conservadas no afectaba a la antigenicidad de las proteínas expresadas. Para analizar la especificidad del reconocimiento se probaron sueros obtenidos de animales infectados por otros patógenos, sueros obtenidos de animales con sintomatologías variadas, fácilmente confundibles con la leishmaniosis canina, o sueros procedentes de animales sanos. En ningún caso se produjo un reconocimiento significativo de la mezcla de antígenos, lo que indicaba una alta especificidad del sistema. Estos resultados indicaron que es posible desarrollar un sistema de diagnóstico serológico basado en el uso de estos antígenos obtenidos como proteínas recombinantes, ya que los valores de sensibilidad y especificidad permiten detectar de forma inequívoca la enfermedad en un elevado número de animales.

## AGRADECIMIENTOS

Durante la realización del presente trabajo, el grupo ha sido financiado por los siguientes proyectos: I+D 0020/94 de la Comunidad Autónoma de Madrid, PTR94-0091 del Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo y BIO96-0405 del Programa Nacional de Biotecnología. También queremos agradecer la ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) BRAY, R. S.: *Ann Rev Microbiol* (1974), **28**:189-217.
- (2) GRAMICCIA, M., GRADONI, L., DI MARTINO, L., ROMANO, R., ERCOLINI, D.: *Acta Tropica* (1992), **50**:357-359.
- (3) MARTY, P., LE FICHOUX, Y., GIORDANA, D., BRUGNETTI, A.: *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1992), **86**:249-250.
- (4) GÓMEZ, L. C.: Tesis Doctoral (1992), Facultad Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- (5) ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, D., CONCEIÇÃO-SILVA, M., SANTOS GOMES, G. M., JANZ, J. G.: *J Parasitol* (1990), **77**:557-561.
- (6) MOLINA, R., AMELA, C., NIETO, J., SAN-ANDRES, M., GONZÁLEZ, F., CASTILLO, J. A., LUCIENTES, J., ALVAR, J.: *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* (1994), **88**:491-493.