

COMUNICACIÓN BREVE

Localización cromosómica de los genes KMP-11 en cepas KP1(+) y KP1 (-) de *Trypanosoma rangeli*

Claudia Urueña ¹, Paola Santander ¹, Hugo Díez ¹, Marleny Montilla ², Ignacio Zarante ³, María del Carmen Thomas⁴, Manuel Carlos López ⁴, Concepción Puerta ¹

¹Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

²Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

³Instituto de Genética, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

⁴Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, España.

En este trabajo se determinó la localización cromosómica de los genes codificantes para la proteína 11 de membrana de los kinetoplastidos en *Trypanosoma rangeli*. Los resultados indican que estos genes se localizan en dos cromosomas de 3.100 y 3.400 kb en la cepa Tre, KP1(-) mientras que en las cepas KP1(+), H14 y Choachí se ubican en 1.600 kb; la cepa Choachí presenta una banda adicional de 1.400 kb. En las cepas Shubachbarina y Munantá de *Trypanosoma cruzi*, los genes KMP-11 se localizaron en una banda cromosómica de 1.490 kb. Estos resultados sugieren la potencialidad de la localización cromosómica de los genes *kmp-11* para diferenciar estos parásitos.

Palabras claves: *Trypanosoma*, *Trypanosoma cruzi*, cariotificación.

Chromosomal localization of the KMP-11 genes in the KP1(+) and KP1(-) strains of *Trypanosoma rangeli*

Genes encoding for the KMP-11 protein were localized on the chromosomes of *Trypanosoma rangeli*. These genes were located in two chromosomes of 3,100 and 3,400 kb in the KP1(-) strain whereas in the KP1(+) H14 and Choachí strains, the genes are located in a chromosome of 1,600 kb. The Choachí strain presents an additional band of 1,400 kb. In the Shubachbarina and Munanta strains of *Trypanosoma cruzi*, the KMP-11 genes are located on a chromosomal band of 1,490 kb. Therefore, the chromosomal localization of the KMP-11 genes presents a potential tool to differentiate among these parasites.

Key words: *Trypanosoma*, *Trypanosoma cruzi*, karyotyping.

Trypanosoma rangeli es un protozoo causante de infección en insectos, animales y el hombre en Latinoamérica. A pesar de carecer de patogenicidad para el humano, su importancia se deriva de que comparte vectores y reservorios con *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas (1).

Recientemente, los estudios de Vallejo *et al.* han evidenciado la existencia de dos grupos de *T. rangeli*, las cepas KP1(+) y las cepas KP1(-). Además, estos grupos circulan en ciclos de transmisión diferentes: las cepas KP1(+) circulan a nivel doméstico, mientras que las cepas KP1(-) circulan a nivel selvático (2).

La KMP-11 es una proteína de membrana ubicada en kinetoplastidos (3), caracterizada en *Leishmania donovani* (4,5), *Leishmania infantum* (6), *Leishmania panamensis* (7), *Trypanosoma brucei* (8,9) y más recientemente, en *T. cruzi* (10). Su amplia distribución en los kinetoplastidos, así como también su elevada conservación a nivel

Correspondencia:

Concepción Puerta, Carrera 7 No. 43-82, Laboratorio 113, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 320 8320, extensión 4024; fax: (571) 320 8320, extensión 4021.

cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 22/10/03; aceptado: 06/05/04

de la secuencia de aminoácidos, y su ausencia en otros protozoos y células mamíferas, sugiere que la proteína KMP-11 desempeña un papel muy importante en estos parásitos. Su homología con las apolipoproteínas B y con las proteínas de citoesqueleto de *Arabidopsis thaliana*, sugiere que KMP-11 participa en la regulación de la presión y la consistencia de la membrana, así como también en la estructuración del citoesqueleto de estos parásitos (3-10).

Además, esta proteína juega un papel predominante en la inducción de inmunidad humoral y celular en estos parásitos (6,7,11-15). Es más, recientemente se ha descrito cómo la inmunización de ratones con una proteína quimérica constituida por la KMP-11 fusionada a la proteína de choque térmico HSP70 de *T. cruzi*, induce protección (16).

Dada la importancia de la proteína KMP-11 en kinetoplastos y la existencia de dos grupos tanto en *T. rangeli* - cepas KP1(+) y KP1(-) -, como en *T. cruzi* - grupos I y II - (17), en este trabajo se determinó la localización cromosómica de los genes codificantes para la proteína KMP-11, con el propósito de aportar herramientas para la caracterización molecular de estas subpoblaciones.

Materiales y métodos

Parásitos

Se trabajó con las cepas H14 (MHOM/Hond/H14), Choachí (IRHO/CO/86/Choachí) y Tre de *T. rangeli* y las cepas Shubacbarina (IRHO/CO/95/Shubacbarina) y Munantá (IRHO/CO/85/Munantá) de *T. cruzi* (18,19). Estas cepas se caracterizaron mediante su patrón de isoenzimas (20) y la amplificación de los minicírculos con los oligonucleótidos S35/S36/KP1L (2). Los epimastigotes se cultivaron en medio REI modificado suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF) y 100 µg/ml de gentamicina, a 24°C.

Ensayos de electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE)

Los parásitos se embebieron en bloques de agarosa a una concentración de 8×10^7 parásitos (21). La quinta parte de dichos bloques se

sometieron a electroforesis en un *Gene Navigator* (Pharmacia Biotech) usando geles de agarosa al 1% en TBE 0,5 X (22). Las condiciones de corrido electroforético fueron: pulsos de 250, 500, 750 y 1000 segundos en un periodo de 96 horas a 84 voltios y 12°C. Después de visualizar los cromosomas teñidos con bromuro de etidio, se transfirieron a membranas de nylon (Biorad) siguiendo el método de transferencia alcalina (22). Los filtros se hibridaron con la sonda marcada con [α - 32 P] d-CTP a 37°C durante 24 h (23). Como sonda se utilizó la región codificante de la KMP-11 de *T. rangeli* obtenida mediante PCR (24). Transcurrida la hibridación, el filtro se lavó a temperatura ambiente durante 15 minutos con cada una de las siguientes soluciones: SSC 2X-SDS 0,1% (p/v), y SSC 1X-SDS 0,1% (p/v). Finalmente, los filtros fueron expuestos a películas de rayos X (Kodak).

Resultados y discusión

Tal como se muestra en la figura 1, los resultados indican que en la cepa Tre de *T. rangeli*, KP1(-), los genes que codifican para la KMP-11 se localizan en dos cromosomas de 3.100 y 3.400 kb (carril 5) mientras que en las cepas H14 y Choachí, KP1(+), se ubican en un cromosoma de 1.600 kb; la cepa Choachí presenta una banda adicional de 1.400 kb (carriles 1 y 2, respectivamente). Es así como este estudio constituye el primer reporte de variabilidad cariotípica entre cepas KP1(+) y KP1(-) de *T. rangeli*. Si bien anteriormente Toaldo *et al.* (25) reportaron la existencia de polimorfismo en la localización cromosómica de los genes codificantes para las β -tubulinas entre cepas de *T. rangeli*, dicha variabilidad no se había asociado con la existencia de dos grupos o poblaciones de este parásito.

Dado que los estudios sobre la organización genómica de los genes codificantes para la KMP-11 en *T. rangeli* indican la existencia de una sola agrupación de dichos genes en este parásito (24), la presencia de dos bandas cromosómicas que contienen los genes KMP-11 puede deberse a variación en el tamaño de los cromosomas homólogos, situación descrita con anterioridad en los tripanosomátidos *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania* (25-27).

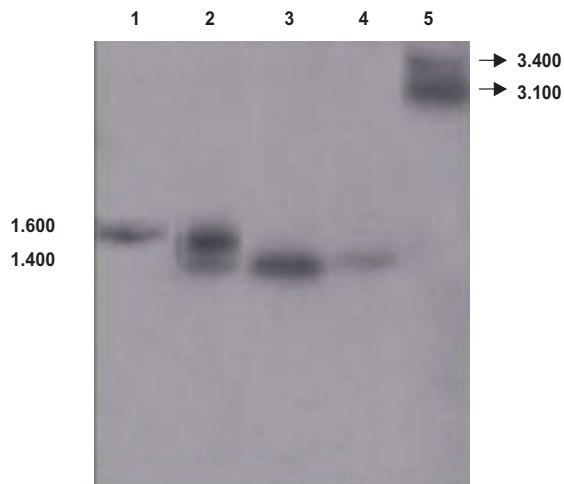


Figura 1. Análisis de Southern *blot* de los cromosomas de los parásitos, hibridado con la sonda codificante para la KMP-11 de *T. rangeli*. Cromosomas de las cepas de *T. rangeli* H14 (1), Choachí (2) y Tre (5), cromosomas de las cepas Munantá (3) y Shubacbarina (4) de *T. cruzi*.

Por su parte, en las cepas Munantá y Shubacbarina, las cuales pertenecen al grupo I de *T. cruzi*, los genes codificantes para la KMP-11 se localizaron en un cromosoma de 1.490 kb (carriles 3 y 4).

Este resultado difiere de lo reportado por Thomas *et al.* (10) quienes encontraron que estos genes en la cepa Y de *T. cruzi*, la cual pertenece al grupo II, se localizan en un cromosoma de 1.900 kb. No obstante, estos resultados pueden explicarse con base en la variabilidad cariotípica detectada entre cepas pertenecientes a los grupos I y II de este parásito. Es así como, por ejemplo, la localización de los genes codificantes para la histona H2A, cruzipaína, 1F8 y FFAg6, difieren entre los grupos I y II de *T. cruzi* (28,29).

De otra parte, la variabilidad en el tamaño de los cromosomas que contienen un gen dado entre *T. cruzi* y *T. rangeli* ha sido previamente reportada por otros autores para el caso de la Gp-57 (25,30), actina, HSP70 (25) e histona H2A (31).

Dentro del anterior contexto, se evidencia claramente la potencialidad de la localización cromosómica de los genes KMP-11 para diferenciar entre *T. cruzi* y *T. rangeli* y entre los grupos de cada uno de ellos.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Gustavo Vallejo, Laboratorio de Investigación en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, por la caracterización de las cepas de *Trypanosoma rangeli* en las subpoblaciones KP1(+) y KP1(-). Este estudio fue financiado por Colciencias contrato No. 190-2000.

Referencias

1. D' Alessandro A, Saravia N. *Trypanosoma rangeli*. En: Giles HM, editor. Protozoal diseases. New York: Oxford University Press Inc.; 1999. p.398-412.
2. Vallejo G, Guhl F, Carranza J, Lozano L, Sanchez J, Jaramillo J, *et al.* kDNA Markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. Act Trop 2002;81:77-82.
3. Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, Jardim A, Olafson RW, Tuckey C, *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. Mol Biochem Parasitol 1995;71: 1-13.
4. Jardim A, Hanson S, Ullman B, McCubbin D, Olafson R, Kay C. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. J Biochem 1995;305:315-20.
5. Jardim A, Funk V, Caprioli R, Olafson R. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. Biochem J 1995;305:307-13.
6. Berberich C, Requena J, Alonso C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. Exp Parasitol 1997; 85:105-8.
7. Ramirez J, Berberich C, Jaramillo A, Alonso C, Velez I. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93: 247-54.
8. Stebeck CE, Baron GS, Beecroft RP, Pearson TW. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein -11 from African Trypanosomes. Mol Biochem Parasitol 1996;81:81-8.
9. Bridge MA, Zhou Q, Koop BF, Pearson TW. Cloning and characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 gene locus of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 1998;91:359-63.
10. Thomas M, García J, Alonso C, López M. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton- associated protein regulated at the translational level. DNA. Cell Biol 2000;19:47-57.

11. Tolson D, Jardim A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckey C, Beecroft RP, *et al.* The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 1994;62:4893-9.
12. Mukhopadhyay S, Sen P, Bhattacharyya S, Majumdar S, Roy S. Immunoprophylaxis and Immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 1999;17:291-300.
13. Marañón C, Thomas MC, Planelles L, López MC. The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cell expressing the *T. cruzi* KMP11 antigen: identification of A2- restricted epitopes. *Mol Immunol* 2001;38:279-87.
14. Ramirez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepulveda JC, Moll H, Soldati D, *et al.* Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen KMP11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 2001;12:455-61.
15. Thomas MC, Longobardo MV, Carmelo E, Marañón C, Planelles L, Patarroyo ME, *et al.* Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human chagasic sera. *Clin Exp Immunol* 2001;123:465-71.
16. Planelles L, Thomas MC, Alonso C, Lopez MC. DNA immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 fused to the KMP11 protein elicits a cytotoxic and humoral immune response against the antigen and leads to protection. *Infect Immun* 2001;69:6558-63.
17. Souto Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;83:141-52.
18. Rodriguez P, Montilla M, Nicholls RS, Zarante I, Puerta C. Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:739-40.
19. Morales L, Romero I, Díez H, Del Portillo P, Montilla M, Nicholls S *et al.* Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol* 2002;102:72-80.
20. Abderrazack SB, Gerrini F, Mathieu-Daudé F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, *et al.* Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. En: Hyde E, editor. *Methods in molecular biology. Protocols in molecular parasitology*. New York: Human Press Inc.; 1993. p.361-82.
21. Clark CG, Lai EY, Fulton C, Cross GAM. Electrophoretic karyotype and linkage groups of the amoebflagellate *Naegleria gruberi*. *J Protozool* 1990;37:400-8.
22. Sambroock JF, Russell DW, Irwin N. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2000.
23. Puerta C, Martin J, Alonso C, López MC. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994;64:1-10.
24. Díez H, López MC, Thomas MC, Puerta C. KMP-11: proteína 11 de membrana de kinetoplastidos. *Univérsitas Scientiarum* 2004;9:29-44.
25. Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding b-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:113-21.
26. Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, *et al.* Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;73:63-74.
27. Cruz AK, Titus R, Beverley SM. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1599-603.
28. Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls RS, *et al.* Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2000;75:203-10.
29. Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, *et al.* Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology* 2002;124:277-86.
30. Tanaka T, Kaneda Y, Lida A, Tanaka M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol* 1994;24:179-88.
31. Puerta C, Cuervo C, Thomas MC, López MC. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Res* 2000;86:916-22.