

Los productos alternativos de LYT1 de *Trypanosoma cruzi* tienen un patrón de localización diferencial

The alternative products of *Trypanosoma cruzi* LYT1 have different localization patterns

Gilberto Ballesteros-Rodea*** Moisés Santillán*** Marisa Cruz-Aguilar*
Claudia Márquez-Dueñas* César Israel Lugo-Caballero* Santiago Martínez-Calvillo†
John Swindle‡ Rebeca Georgina Manning-Cela*

Abstract

LYT1 is a molecule with lytic activity under acidic conditions that, as genetically demonstrated, participates in the infection and stage transition of *T. cruzi*. The differing functions of this protein result from alternative trans-splicing, resulting in proteins that contain either a secretion and nuclear sequence (LYT1s) or the nuclear sequence alone (LYT1n). To determine the localization of different LYT1 products, transgenic parasites expressing LYT1s or LYT1n fused to the enhanced green fluorescence sequence were analyzed. LYT1s-EGFP localized to the flagellum, vacuoles, membrane and regions of the nucleus and kinetoplast; LYT1n-EGFP localized to the nucleus and kinetoplast, and occasionally in vacuoles. These results show that even though different LYT1 products localize to the same sites, they are also found in different intracellular organelles and microenvironments, which could influence their multifunctional behavior.

Key words: FLAGELLUM, TRANSFECTION, PARASITES, INFECTIVITY, ALTERNATIVE TRANS-SPLICING.

Resumen

LYT1 es una molécula con actividad lítica en condiciones ácidas, que según se demostró genéticamente, participa en el proceso de infección y transición de estadio de *T. cruzi*. Su diferente funcionalidad es resultado de la producción de dos proteínas, obtenidas por trans-empalme alternativo, que contienen una secuencia de secreción y una nuclear (LYT1s) o únicamente la secuencia nuclear (LYT1n). Para evaluar la localización de los diferentes productos de LYT1, se analizaron parásitos transgénicos que expresan la secuencia de LYT1s o LYT1n fusionada con la secuencia de la verde fluorescente. LYT1s-EGFP se localiza en flagelo, vacuolas, membrana y región del núcleo y cinetoplasto; mientras que, LYT1n-EGFP se localiza en la región del núcleo y cinetoplasto, y ocasionalmente en vesículas. Estos resultados muestran que aún cuando los distintos productos de LYT1 comparten algunos sitios de localización, también se encuentran en distintos organelos y microambientes intracelulares que podrían influir en su comportamiento multifuncional.

Palabras clave: FLAGELO, TRANSFECCIÓN, PARÁSITOS, INFECTIVIDAD, TRANS-EMPALME ALTERNATIVO.

Recibido el 15 de octubre de 2010 y aceptado el 13 de mayo de 2011.

* Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360, México, D.F. Correos electrónicos: gibaro90@hotmail.com, mari_cruz77@yahoo.com, caya_tobi@yahoo.com.mx, cesarl@mexico.com, rmanning@cinvestav.mx

** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, México, D.F. Correo electrónico: gibaro90@hotmail.com

*** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Monterrey, Vía del Conocimiento 201, Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, km 9.5 de la autopista nueva al aeropuerto, Apodaca, Nuevo León, 66600, México. Correo electrónico: msantillan@cinvestav.mx

† UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios 1, col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 54090, México. correo electrónico: scalv@campus.iztacala.unam.mx

‡ Comple Gen, Inc, Seattle, WA 98104, USA. Correo electrónico: jtswindle@complegen.com

Responsable de correspondencia: Rebeca G. Manning Cela, Tel.: 57473322, Fax: 57473938, correo electrónico: rmanning@cinvestav.mx

Introduction

American trypanosomiasis is a parasitic disease caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects several species of mammals and is considered an important zoonosis. This parasite has a biphasic life cycle in the following four different developmental stages: two stages in hemipteran insects of the family Reduviidae (epimastigote and metacyclic trypomastigote) and two stages in mammalian hosts (blood trypomastigote and amastigote) where the intracellular cycle of the parasite takes place.¹

The intracellular cycle is a complex process involving several consecutive steps, beginning with the recognition of and adherence to target cells by specific molecules present on the membrane of the parasite. After internalization by a parasitophorous vacuole, the parasite is released into the host cell's cytoplasm, where it differentiates into an amastigote, replicates and then differentiates into a blood trypomastigote, which then lyses the infected cell and spreads infection.²

T. cruzi, like many intracellular organisms, requires lytic proteins to complete its life cycle because it depends on them to escape from the parasitophorous vacuole or from the interior of host cells; however, very few of these proteins have been recently characterized.²

Thus far, the participation of two molecules in the infection process of *T. cruzi* has been genetically demonstrated.^{3,4} One of these proteins is *LYT1*, a molecule that has lytic activity under acidic conditions and is involved in the infection and stage transition process of the parasite. The *LYT1* gene was cloned from an expression library made from the *T. cruzi* Y strain using the cross-reaction presented by the antibody against the C9 complement component. This molecular characterization indicated that *LYT1* is a single-copy gene with an open reading frame of 1,653 bp and is present in two alleles that encode a 552 aa protein, which showed no sequence homology to proteins with known function.³ Therefore, to elucidate its function, *LYT1* deficient parasites were obtained and characterized. It was found that expression of *LYT1* is not essential for epimastigotes, and that these null parasites showed the following main phenotypes: decreased infection capacity, accelerated stage development *in vitro* and decreased hemolytic activity.³

The different roles of this molecule were explained by a *LYT1* 5' extension, and RT-PCR experiments demonstrated the presence of three transcripts that were obtained by alternative trans-splicing. The presence of the full protein containing the signal sequence for secretion and a nuclear sequence was related to the infectivity process. The truncated protein (-28 aa), which lacked the signal sequence for secretion but contained

Introducción

La tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria ocasionada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* que afecta a varias especies de mamíferos y es considerada una zoonosis importante. El parásito presenta un ciclo de vida bifásico en el que se alternan cuatro estadios de desarrollo diferentes, dos en insectos hemípteros de la familia Reduviidae (epimastigote y tripomastigote metacíclico) y dos en el hospedero mamífero (amastigote y tripomastigote sanguíneo) en donde se lleva a cabo el ciclo intracelular del parásito.¹

El ciclo intracelular es un proceso complejo que involucra diversos pasos consecutivos, que inicia con el reconocimiento y adhesión a la célula blanco por parte de moléculas específicas de la membrana del parásito. Después de su internalización mediante una vacuola parasitófora, el parásito es liberado al citoplasma de la célula hospedera en donde se diferencia a amastigote, replica y diferencia nuevamente a tripomastigote sanguíneo, el cual lisa a la célula infectada y propaga la infección.²

T. cruzi, al igual que muchos microorganismos intracelulares, requiere de proteínas líticas para completar su ciclo de vida, ya que depende de éstas para poder escapar de la vacuola fagocítica o del interior de la célula hospedera. Sin embargo, muy pocas han sido caracterizadas a la fecha.²

Hasta el momento se ha demostrado genéticamente la participación de dos moléculas en el proceso de infección de *T. cruzi*.^{3,4} Una de estas es *LYT1*, que es una molécula que presenta actividad lítica en condiciones ácidas y que participa en el proceso de infección y de transición de estadio del parásito. El gen *LYT1* se clonó a partir de una biblioteca de expresión de *T. cruzi* de la cepa Y, aprovechando la reacción cruzada que presentó con el anticuerpo contra el componente C9 del complemento. La caracterización molecular indicó que *LYT1* es un gen de copia única, con un marco de lectura abierto de 1,653 pb presente en dos alelos que codifica para una proteína de 552 aa, cuya secuencia no mostró homología con proteínas con función conocida.³ Por lo tanto, para dilucidar su función se obtuvieron y caracterizaron parásitos nulos, encontrando que la expresión de *LYT1* no es esencial en epimastigotes y que estos parásitos nulos mostraban 3 fenotipos sobresalientes: una capacidad infectiva disminuida, un desarrollo acelerado *in vitro* y una actividad hemolítica disminuida.³

La diferente función de esta molécula se explica mediante experimentos de extensión 5' y RT-PCR que demostraron la presencia de tres transcritos obtenidos por trans-empalme alternativo. Dos codifican para la

the nuclear sequence, was related to the stage differentiation process.⁵ It was also shown that alternative trans-splicing of *LYT1* is regulated differentially in the developmental stages of the parasite where the transcripts encoding the full protein are preferentially expressed in trypomastigote and amastigote, and the transcript encoding the truncated protein is preferentially expressed in epimastigotes.⁵ Parasites with a dominant negative mutant of *LYT1* had a phenotype similar to that observed in null mutants, suggesting that *LYT1* is possibly part of a protein complex.⁶ This possibility was evaluated by co-immunoprecipitation and GST pull-down experiments, which showed that *LYT1* interacts with diverse proteins whose functions can affect the phenotype of infection, stage transition and motility of the parasite (unpublished results).

These findings suggested that the presence of different location sequences in *LYT1* and its possible interaction with other proteins could be the result of differential localization that expose the protein to different microenvironments and impact its multi-functionality. Therefore, further characterization of this protein and evaluation of the localization of different *LYT1* products was conducted in this study.

Material and methods

Parasites

Wild type (WT) and transgenic *T. cruzi* CL-Brener strains were cultured in liver infusion tryptose LIT medium⁷ supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5% penicillin (10,000 IU) / streptomycin (10,000 µg) and 1% of hemin (5 mg/ml) at 28°C.

Construction of pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP and pTREXn-LYT1n-EGFP plasmids

The full (*LYT1s*) and truncated (*LYT1n*) *LYT1* sequences obtained by PCR were cloned into the pEGFP-N1 vector* using the *HindIII* y *KpnI* restriction sites. *LYT1s* contained the full sequence of the *LYT1* allele b (GenBank AF320626) from the first ATG (+1) and had a mutation in the second ATG (+85); this sequence was obtained by performing two consecutive PCR reactions using the following oligos: LYT13 S and LYT17 AS (Table 1) and PBS4.3 Kb-*LYT1* allele b (GenBank AF320626) DNA as a template, followed by a second PCR reaction using the oligos LYT14 S and LYT17 AS and the previous PCR product as the template. As the pTREXn-*LYT1s*-EGFP plasmid contains two 3' trans-splicing acceptor sites, one from the *HXI* vector sequence⁸ and the other from position +10 of

proteína completa que contiene una secuencia señal de secreción y una secuencia nuclear, relacionada con el proceso de infectividad. Y el tercero, que codifica para la proteína truncada (-28 aa) sin la secuencia señal de secreción y con la secuencia nuclear, relacionada con el proceso de diferenciación.⁵ También se demostró que el trans-empalme alternativo de *LYT1* es regulado diferencialmente en los distintos estadios de desarrollo del parásito, en donde los transcritos que codifican para la proteína completa se expresan preferencialmente en tripomastigotes y amastigotes, mientras que el transcrito que codifica para la proteína truncada se expresa preferencialmente en epimastigotes.⁵ El análisis de una mutante dominante negativa de *LYT1*, mostró que presenta los tres fenotipos obtenidos en los mutantes nulos, sugiriendo que posiblemente *LYT1* es parte de un complejo proteínico.⁶ Esta posibilidad se evaluó por ensayos de co-inmunoprecipitación y co-precipitación por afinidad a GST por centrifugación. El resultado fue que *LYT1* interacciona con diversas proteínas cuyas funciones están relacionadas con el fenotipo de infección, de transición de estadio y de motilidad del parásito (resultados no publicados).

Estos antecedentes sugieren que la presencia de las diferentes secuencias de localización en *LYT1*, así como su posible interacción con distintas proteínas, pudiera ser resultado de una localización diferencial que expone a la proteína a un microambiente diferente, lo que impactaría en su multi-funcionalidad. Por lo tanto, en el presente trabajo se continuó con su caracterización, evaluando la localización de los distintos productos de *LYT1*.

Material y métodos

Parásitos

Los parásitos de *T. cruzi* cepa CL-Brener tipo silvestre (WT-*Wild Type*) y transgénicos se cultivaron en medio infusión de hígado y triptosa LIT,⁷ complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5% de penicilina (10,000 UI) / estreptomina (10,000 µg) y 1% de hemina (5 mg/ml), a una temperatura de 28°C.

Construcción de pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP y pTREXn-LYT1n-EGFP

Las secuencias de *LYT1* completa (*LYT1s*) y truncada (*LYT1n*), obtenidas por PCR fueron clonadas en el vector pEGFP-N1* en los sitios de restricción *HindIII*

*Clontech, EUA.

the *LYT1* coding sequence, it was necessary to incorporate a conservative point mutation at position +87 (C to G) to remove the *LYT1* translation start site at position +85, and to only produce the full *LYT1s*-EGFP protein. *LYT1n* contained the truncated *LYT1* sequence that started at the second ATG at position +85, which was obtained using the following oligos: LYT12 S and LYT17 AS (Table 1) and PBS4.3 Kb-*LYT1* allele b (GenBank AF320626) DNA as the template. The obtained plasmids were digested with *HindIII* y *NoI* enzymes to obtain the *LYT1s*-EGFP and *LYT1n*-EGFP fragments, and were then sub-cloned into the pTREXn vector⁸ that was also digested with the same restriction enzymes to obtain the pTREXn-*LYT1s*-EGFP and pTREXn-*LYT1n*-EGFP plasmids (Figure 1). As a control, the sequence that encodes enhanced green fluorescent protein was sub-cloned from the pEGFP-N1 plasmid into pTREXn plasmid using the *HindIII* and *NoI* restriction sites to obtain pTREXn-EGFP (Figure 1). All obtained plasmids were sequenced to verify correct construction.

Obtaining of the transgenic *LYT1s*-EGFP and *LYT1n*-EGFP parasites

WT epimastigotes (3×10^8) were washed with cold LIT medium that was not supplemented and were centrifuged at 800 *g* for 10 min. Parasites were resuspended in 350 μ l LIT medium that was not supplemented and were placed in electroporation cuvettes (BTX 2 mm) at 4°C. Approximately 100 μ g DNA in 40 μ l water were added to the samples, which were then electroporated at 300 V and 12 ms using BTX ECM 830 equipment. After 5 min at room temperature, epimastigotes were resuspended in 10 ml supplemented LIT medium⁷ and were incubated at 28°C for 24 h. Subsequently, parasites were selected with G418 at a concentration of 500 μ g/ml. Once the resistant parasites were obtained, they were cultured in the absence of selective chemicals for one week. Under these conditions, parasites eliminated the extrachromosomal transfected sequence and died when they were subjected to a second round of selection. The stably transfected parasites were cloned by limiting dilution without the presence of selective chemical. During the cloning and subsequent sub-cultures, cells remained fluorescent, which proved that stable transfection of the parasites had occurred.

The pTREXn-EGFP, pTREXn-*LYT1s*-EGFP and pTREXn-*LYT1n*-EGFP plasmids were used to obtain the transfected parasites EGFP, *LYT1s*-EGFP and *LYT1n*-EGFP, respectively.

y *KpnI*. 1) *LYT1s*: contiene la secuencia completa de *LYT1* alelo b (*Genebank* AF320626) a partir del primer ATG (+1) y una mutación en el segundo ATG (+85), obtenida en dos reacciones de PCR consecutivas empleando los oligos: LYT13 S y LYT17 AS (Cuadro 1) y como templado, ADN de PBS4.3 Kb-*LYT1* alelo b (*Genebank* AF320626) y posteriormente los oligos LYT14 S y LYT17 AS y el producto de PCR anterior como templado. Como el plásmido pTREXn-*LYT1s*-EGFP contiene dos sitios 3' aceptores del trans-empalme, uno en la secuencia *HXI* del vector⁸ y otro en la posición +10 de la secuencia codificante de *LYT1*, fue necesario incorporar una mutación puntual conservativa en la posición +87 (C por G) de *LYT1* para eliminar el sitio de inicio de traducción de la posición +85, y que se produzca únicamente la proteína completa de *LYT1s*-EGFP. 2) *LYT1n*: contiene la secuencia de *LYT1* truncada que inicia a partir del segundo ATG de la posición +85 obtenida utilizando los oligos: LYT12 S y LYT17 AS (Cuadro 1) y ADN de PBS4.3 Kb-*LYT1* alelo b (*GeneBank* AF320626) como templado. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas *HindIII* y *NoI* para obtener los fragmentos *LYT1s*-EGFP y *LYT1n*-EGFP y sub-clonarlos en el vector pTREXn⁸ digerido con las mismas enzimas de restricción, para obtener los plásmidos pTREXn-*LYT1s*-EGFP y pTREXn-*LYT1n*-EGFP (Figura 1). Como testigo se sub-clonó la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente aumentada (EGFP), obtenida de pEGFP-N1 en pTREXn en los sitios *HindIII* y *NoI* para obtener pTREXn-EGFP (Figura 1). Los plásmidos fueron secuenciados para verificar su correcta construcción.

Obtención de los parásitos transgénicos de *LYT1s*-EGFP y *LYT1n*-EGFP

Los epimastigotes WT (3×10^8) se lavaron con medio LIT frío no complementado, centrifugando a 800 *g* por 10 min. Los parásitos se re-suspendieron en 350 μ l de medio LIT sin complementar y se colocaron en cubetas de electroporación (BTX 2 mm) a 4°C. A la muestra se le adicionó 100 μ g del ADN/40 μ l de agua y se electroporó a 300 V y 12 ms con un equipo BTX ECM 830. Después de 5 min a temperatura ambiente, los epimastigotes se resuspendieron en 10 ml de medio LIT⁷ complementado y se incubaron a 28°C durante 24 h. Posteriormente los parásitos se seleccionaron con G418 a una concentración de 500 μ g/ml. Una vez obtenidos los parásitos resistentes, estos se cultivaron nuevamente en ausencia del selector durante una semana. En estas condiciones los parásitos que contienen la secuencia transfecteda de manera extracromosomal la eliminaron y murieron cuando se sometieron a una segunda ronda de selección. Los parásitos

Obtaining total protein extracts (TPE) of *T. cruzi*

WT epimastigotes of the CL-Brener strain and stably transfected parasites (1×10^8) were harvested and washed 3 times with 1 ml PBS (pH 7.2) at 3,200 g and 4°C for 5 min. The obtained pellets were resuspended in 500 µl lysis buffer A [50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1% Nonidet 40 (NP40), 5 mM EDTA, 1% SDS], 100 µl protease inhibitor mix* and 15 µl 100 mM ZnCl₂. Samples were incubated at 4°C for 20 min and were sonicated 3 times for 1 min with intervals of 10 sec at an amplitude of 40% (8 watts).** Samples were centrifuged at 14,000 g for 10 minutes, and the supernatant was recovered. Protein concentrations were measured using the Lowry method, and their integrity was verified on 12% SDS- PAGE acrylamide gels that stained with Coomassie blue.

Analysis of EGFP and chimeric proteins LYT1s-EGFP and LYT1n-EGFP expression in transfected parasites by immunoblotting

TPE (10 µg) were resuspended in 1x Laemmli's buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 3% SDS, 5% β-mercaptoethanol),⁹ boiled for 5 min and loaded

fueron clonados por dilución limitante sin presencia del selector. Durante la clonación y en los sub-cultivos posteriores, las células permanecieron fluorescentes lo que demostró la obtención de parásitos transfectados de manera estable.

Los plásmidos pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP y pTREXn-LYT1n-EGFP fueron utilizados para la obtención de los parásitos transgénicos EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP, respectivamente.

Obtención de extractos proteínicos totales (EPT) de *T. cruzi*

Los epimastigotes de la cepa CL-Brener tipo silvestre (*WT-wilde type*) y los parásitos transfectados establemente (1×10^8) se cosecharon y fueron lavados 3 veces con 1 ml de PBS a pH 7.2 a 3,200 g a 4°C por 5 min. La pastilla obtenida fue resuspendida en 500 µl de amortiguador de lisis A (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, Nonidet 40 1% (Np40), EDTA 5 mM, SDS 1%), 100 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas* y 15 µl de ZnCl₂ 100 mM. La muestra fue incubada a 4°C durante 20 min y sonicada 3 veces por 1 min con intervalos de 10 seg a una amplitud de 40% (8 watts) en un sonicador.** La muestra se centrifugó a 14,000 g por 10 minutos; al

*Complete®(Roche), Suiza.

**Sonics and Materials, Inc., EUA.

CUADRO 1

Secuencias de oligonucleótidos de ADN que fueron usados en las construcciones
DNA oligonucleotide sequences that were used in constructs

Name	Sequence	Characteristics
LYT-12 S	GGG CAA AGC TTT CTA GAA TGG GAC GTG CCG GCC CCC G	Sense oligonucleotide of 37b. Nucleotides 6 to 11 contain a <i>Hind</i> III site. Nucleotide 18 to 37 contains the site +1 to +20 from the coding sequence of LYT1 allele b (GenBank AF320626).
LYT-13 S	GTA GCA CCC ACA GCA GAC ACA CGG CCG ACG TGC CGC GGG GCT GCC ATT GCG AAT AAC TTT ATC GGA CGA CGT G	Sense oligonucleotide of 73b. Nucleotide 63 contains a point mutation in which G is replaced by C in the second ATG of the nucleotide +85 from the coding sequence of LYT1 allele b (GenBank AF320626).
LYT-14 S	GGG CAA AGC TTT CTA GAA TGC GGA AGA AAG CCG CAG CAT TAG TAG CAC CCA CAG CAG ACA C	Sense oligonucleotide of 61b. Nucleotides 6 to 11 contain a <i>Hind</i> III site. Nucleotides 18 to 61 contain the +1 to +44 sequence of the coding sequence of LYT1 allele b (GenBank AF320626).
LYT-17 AS	GGG GTA CCC CAT CAG CTG CCA GCA TGT TTT C	Antisense oligonucleotide of 31b. Nucleotides 3 to 6 contain a <i>Kpn</i> I site. Nucleotides 7 to 31 contain the +1857 to +1841 sequence of the coding sequence of LYT1 allele b (GenBank AF320626).

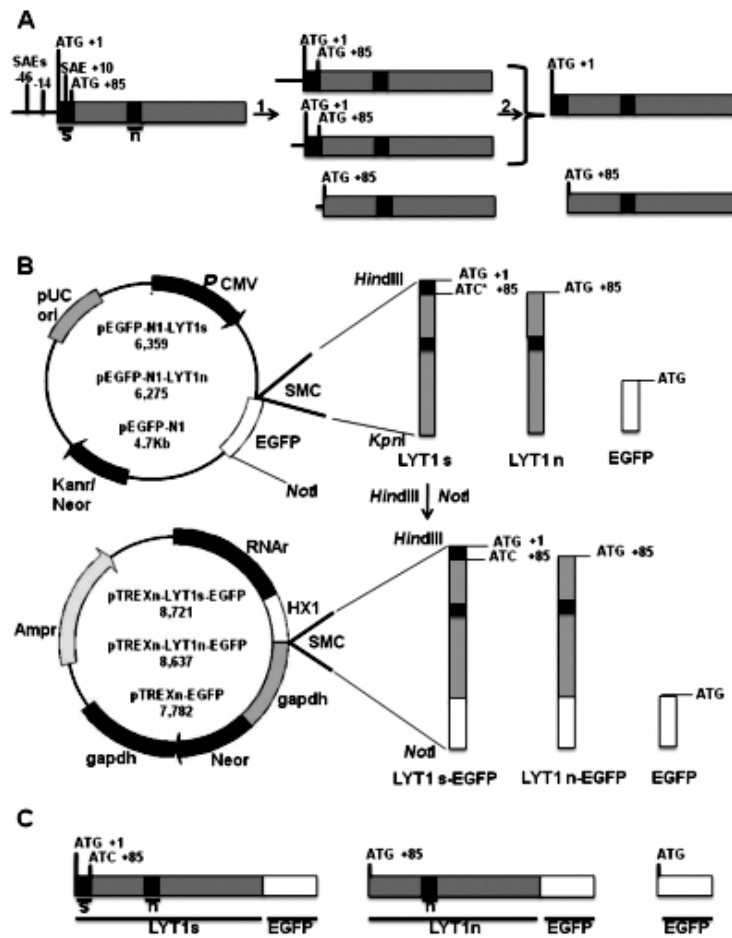


FIGURA 1. A) Esquema que representa la secuencia genómica de *LYT1* (conteniendo un sitio aceptor de trans-empalme (SAE) en la posición +10) y parte de la región flanqueante 5' (conteniendo dos sitios aceptores del trans-empalme en la posición -46 y -14). Se marcan las secuencias que codifican para la secuencia señal de secreción (s) y la secuencia de localización nuclear (n) (panel izquierdo). Después de la transcripción y procesamiento 5' por trans-empalme y 3' por poliadenilación (1), se obtienen tres transcritos trans-alternativos de *LYT1*, dos que codifican para la misma proteína conteniendo la secuencia señal de secreción y la secuencia de localización nuclear y que sólo difieren en su UTR5', y un tercero que codifica para la proteína truncada conteniendo únicamente la secuencia de localización nuclear (panel central). Después de la traducción (2) se obtienen dos productos de *LYT1*, uno completo sintetizado a partir del ATG de la posición +1 y otro truncado a partir del ATG de la posición +85 (panel derecho). **B)** La secuencia completa (*LYT1s*) y truncada (*LYT1n*) de *LYT1* fueron clonadas en el vector pEGFP-N1 en los sitios *HindIII* y *KpnI*, obteniendo los plásmidos pEGFP-*LYT1s* y pEGFP-*LYT1n* respectivamente (panel superior). Las secuencias de fusión (*LYT1s-EGFP* y *LYT1n-EGFP*), así como la de *EGFP* fueron liberadas y subclonadas en el vector de expresión pTREXn en los sitios *HindIII* y *NotI*, obteniendo las construcciones pTREXn-*LYT1s-EGFP*, pTREXn-*LYT1n-EGFP* y pTREXn-*EGFP* respectivamente (panel inferior). *Mutación puntual conservativa en la posición +87 (C por G) de la secuencia de *LYT1* para eliminar el sitio de inicio de traducción de la posición +85 para asegurar la traducción únicamente del producto completo. **C)** Parásitos transfectados de manera estable con los vectores pTREXn-*LYT1s-EGFP*, pTREXn-*LYT1n-EGFP* y pTREXn-*EGFP*, expresaron las proteínas de fusión *LYT1s-EGFP*, *LYT1n-EGFP* y la proteína *EGFP* respectivamente.

FIGURE 1. A) Scheme represents the genomic sequence of *LYT1* (containing a trans-splicing acceptor site (SAS) at position +10) and part of the 5' flanking region (containing two trans-splicing acceptor sites at positions -46 and -14). Coding sequences for secretion signal (s) and nuclear localization (n) are marked (left panel). After transcription, 5' trans-splicing and 3' polyadenylation processing (1), three alternative transcripts of *LYT1* are obtained, two that encode the same protein containing the secretion signal sequence and nuclear localization sequence that only differ in the 5' UTR, and a third transcript encoding the truncated protein containing only the nuclear localization sequence (middle panel). After translation (2), two *LYT1* products are obtained, one full form synthesized from the ATG of position +1 and a truncated form from the ATG of position +85 (right panel). **B)** Full (*LYT1s*) and truncated (*LYT1n*) sequences of *LYT1* were cloned into the pEGFP-N1 vector into the *HindIII* and *KpnI* sites, obtaining the pEGFP-*LYT1s* and pEGFP-*LYT1n* plasmids, respectively (top panel). The fused sequences (*LYT1s-EGFP* y *LYT1n-EGFP*), as well as the *EGFP* sequence, were digested and subcloned into the pTREXn expression vector into the *HindIII* and *NotI* sites, obtaining the pTREXn-*LYT1s-EGFP*, pTREXn-*LYT1n-EGFP* and pTREXn-*EGFP* constructs, respectively (lower panel). *Conservative mutation at position +87 (C to G) in the *LYT1* coding sequence to eliminate the translation start site at position +85 and to obtain only the full *LYT1* product. **C)** The parasites stably transfected with pTREXn-*LYT1s-EGFP*, pTREXn-*LYT1n-EGFP* and pTREXn-*EGFP* expressed the *LYT1s-EGFP*, *LYT1n-EGFP* and *EGFP* fusion proteins, respectively.

onto 4% SDS-PAGE gels. Samples were electro-transferred onto nitrocellulose membranes at 100 V for one hour. After verifying the effectiveness of transfer using Ponceau red stain, membranes were washed with 1x PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) and blocked with 6% milk-PBS (1x)* for 1 h. Membranes were incubated with primary α -GFP IgG_{2a} antibody that was produced in mouse** at a 1:1000 dilution in 6% milk-PBS (1x)* for 1 h. After washing membranes with 1x PBS for 10 min, 0.05% Tween-20-PBS (1x) for 10 min and 1x PBS for 10 min, samples were incubated for 1 h with secondary goat*** α -mouse IgG (H + L) antibody that was conjugated to peroxidase at a 1:5000 dilution in 6% milk-PBS (1x)*. Membranes were washed again using the same conditions as those used for primary antibody and were measured by the chemiluminescence assay using ECL reagent (Amersham cat: RPN2106) as peroxidase substrate, according to the manufacturer's protocol.

Determination of chimeric proteins localization by epifluorescence

Parasites (4×10^6) were washed with PBS, centrifuged at 800 g for 6 min and were resuspended in 500 μ l of 4% paraformaldehyde. Approximately 10 μ l sample was dropped over poly-L-lysine-treated slides inside circles delimited with a liquid-repellent slide marker pen.† Samples were allowed to dry in wet conditions at room temperature for 30 min, were washed with PBS and then permeabilized with absolute methanol for 10 min. After washing with PBS, 15 μ l DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)‡ were added at a dilution of 1:1000 for 5 min. Then samples were washed again and after drying at room temperature, were mounted in Airvol (16.8% arvitrol in a solution of 100 mM NaCl, 5 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄). Parasites were observed using the epifluorescence microscope* equipped with a 60X/1.25objective,** and images were captured with a camera*** adapted to the microscope and analyzed using the Image-Pro Plus 6.0 software. For analysis by confocal fluorescence microscopy, a Leica microscope† with excitation filters of 400 nm multiphoton for DAPI and argon 488 nm for EGFP and a 63X objective 1.4 with immersion oil was used. Images were captured with LAS AF software (Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite) 1.7.0 build 1240.‡

Analysis of epimastigote movement patterns

Images and videos of different parasite lines were captured using the hanging drop technique with a Leica confocal fluorescence microscope,† a 488-nm excita-

final se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Lowry y su integridad se verificó en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12%, teñidos con azul de Coomassie.

Análisis de la expresión de EGFP y de las proteínas quiméricas LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP en los parásitos transgénicos por inmunotransferencia

Los EPT (10 μ g) se re-suspendieron en amortiguante Laemli 1x (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glicerol, 3% SDS, 5% β -mercaptoetanol),⁹ fueron hervidos 5 min y cargados en geles SDS-PAGE al 4%. Las muestras se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V por una hora. Después de verificar la eficacia de transferencia con rojo Ponceau, las membranas se destiñeron con PBS 1x (NaCl 0.14 M, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM) y se bloquearon con PBS1x-leche* al 6% durante 1 h. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario α -GFP IgG_{2a} producido en ratón** a una dilución 1:1000 en PBS1x-leche* al 6% durante 1 h. Después de lavar la membrana con PBS 1x durante 10 min, PBS 1x-Tween-20 0.05% 10 min y PBS 1x por 10 min, se incubó 1 h con el anticuerpo secundario α -mouse IgG (H+L) conjugado con peroxidasa producido en cabra*** a una dilución 1:5000 en PBS1x-leche* al 6%. La membrana se lavó nuevamente usando las mismas condiciones que para el anticuerpo primario y se reveló el ensayo por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham cat: RPN2106) como sustrato de la peroxidasa de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

Determinación de la localización de las proteínas quiméricas por epifluorescencia

Los parásitos (4×10^6) se lavaron con PBS centrifugando a 800 g durante 6 min y se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído al 4%. Se tomaron 10 μ l de muestra y se goteó en áreas delimitadas con lápiz graso en la superficie de laminillas siliconizadas.† La muestra se dejó secar en condiciones húmedas a temperatura ambiente durante 30 min, se lavó con PBS pre-enfriado en agitación y se permeabilizó con metanol absoluto durante 10 min. Después de lavar con PBS, se adicionaron 15 μ l de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)‡ a una dilución de 1:1000 durante 5 min, se lavó nuevamente y después

*Svelty (Nestlé S.A.), Suiza.

**Santa Cruz Biotechnology # cat. GFP B-2 sc-9996, EUA.

***Zymed Laboratories # cat. 81-6520, EUA.

†Silane-pep™ slides sigma Diagnostics, EUA.

‡Molecular Probes™ Invitrogen detection technologies, EUA.

tion filter for EGFP and the LAS AF software. Trajectories of the parasites were analyzed from videos obtained using the Image Pro Plus 6.0 software.

Results

Cloning and obtaining of parasites stably transfected with pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP and pTREXn-LYT1n-EGFP

In order to express the different variants of LYT1 (full and truncated) in parasites, the coding sequences of these proteins were cloned into an expression vector for *T. cruzi*, as described in the Material and methods. In kinetoplasts, it is not possible to use heterologous promoters, so the pTREXn expression vector containing a homologous ribosomal promoter and the *HXI* sequence was used in order to provide the trans-splicing acceptor site to the gene for higher expression levels. These constructs were used to stably transfect WT epimastigotes, and the expression of LYT1s-EGFP, LYT1n-EGFP and EGFP (control) were characterized by immunoblotting using an α -GFP antibody.

Figure 2 shows antibody recognition of the bands with the expected molecular weights of 26 kDa for EGFP parasites (lane 1), approximately 82 kDa for LYT1ps-EGFP (lane 2) and 86 kDa for LYT1pn-EGFP (lane 3). It was not possible to detect the separation of the 82 kDa and 86 kDa bands due to the limits of the system's resolution. As expected, there was no recognition by the antibody in WT parasites (data not shown). These results indicate that the LYT1s-EGFP, EGFP-LYT1n and EGFP parasites express exogenous proteins and demonstrate the successful generation of stable lines.

The full and truncated LYT1 proteins have different localization patterns

To determine the localization of the different exogenous products of LYT1 in transfected epimastigotes, the localization of EGFP was assessed by confocal microscopy as an indirect measure of the presence of LYT1s and LYT1n fused to EGFP.

As shown in Figure 3, microscopy analysis of EGFP-fluorescent epimastigotes showed that exogenous green fluorescent protein is distributed throughout the parasite. As expected, when EGFP fluorescence and DAPI staining of the nucleus and kinetoplast was analyzed, no co-localization was observed. Alternatively, while LYT1s-EGFP parasites had green fluorescence in the nucleus, kinetoplast, flagellum, vesicles and membrane, LYT1n-EGFP parasites showed green

de secar a temperatura ambiente, se montó la preparación en Airvol (16.8% de arvitól en una solución de NaCl 100 mM, KH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 10 mM). Los parásitos se observaron al microscopio de epifluorescencia* equipado con un objetivo 60X/1.25** y las imágenes se capturaron con una cámara*** adaptada al microscopio y se analizaron con el programa Image-Pro Plus 6.0. Para el análisis por fluorescencia confocal se utilizó un microscopio Leica,† filtros de excitación: multifotónico 400 nm para DAPI y argón 488 nm para EGFP, y un objetivo 63X 1.4 con aceite de inmersión. Las imágenes fueron capturadas con el programa LAS AF (*Leica Application Sui Advanced Fluorescence Lite*) 1.7.0 build 1240.‡

Análisis del patrón de movimiento de los epimastigotes

Se capturaron imágenes y videos de las diferentes líneas de parásitos, utilizando la técnica de gota suspendida, con un microscopio de fluorescencia confocal Leica,† un filtro de excitación de 488 nm para EGFP y el programa LAS AF. Las trayectorias de los parásitos se analizaron a partir de los videos obtenidos utilizando el programa Image Pro Plus 6.0.

Resultados

Clonación y obtención de parásitos transfectados establemente con pTREXn-EGFP, pTREXn-LYT1s-EGFP y pTREXn-LYT1n-EGFP

A fin de expresar las diferentes variantes de LYT1 (completa y truncada) en los parásitos transgénicos, se clonaron sus secuencias codificantes en un vector de expresión para *T. cruzi*, como se describe en material y métodos. En cinetoplastos no es posible utilizar promotores heterólogos, por lo que se utilizó el vector de expresión pTREXn que contiene un promotor ribosomal homólogo y la secuencia *HXI* que le confiere el sitio aceptador del trans-empalme al gen a expresar; de este modo se obtuvieron altos niveles de expresión. Las construcciones se usaron para transfectar de manera estable epimastigotes WT, y se caracterizó la expresión de LYT1s-EGFP, LYT1n-EGFP y EGFP (tes-

*Olympus BX41, Japón.

***Oil Iris* Ph3 UPlan FL N, EUA.

****Evolution VF Fast Cooled Color* Media Cybernetics, EUA.

†Microsystems TSC SP5, DM 1600, Mo, Alemania.

‡Leica Microsystems, Alemania.

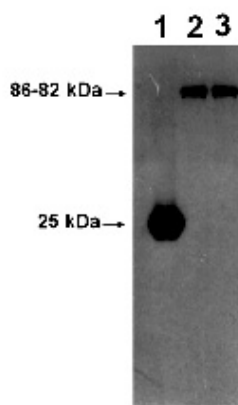


FIGURA 2. Análisis de la expresión de EGFP y de las proteínas quiméricas LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP por inmunotransferencia. Extractos totales de proteínas de parásitos transgénicos, EGFP (carril 1), LYT1s-EGFP (carril 2) y LYT1n-EGFP (carril 3), se corrieron en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes, se transfirieron y se revelaron las proteínas exógenas usando un anticuerpo α -EGFP.

FIGURE 2. Analysis of EGFP expression and LYT1n-EGFP, LYT1s-EGFP and EGFP chimeric proteins by immunoblotting. Protein extracts of EGFP (lane 1), LYT1s-EGFP (lane 2) and LYT1n-EGFP (lane 3) from transgenic parasites were run on polyacrylamide gels under denaturing conditions, transferred and the exogenous proteins were revealed using an EGFP antibody (α -EGFP).

fluorescence mainly in the nucleus, kinetoplast and sometimes in vesicles. These results showed that both products share the same localization in the nucleus, kinetoplast and vesicles, which is not surprising, since they share the same nuclear localization sequence and are expected to be transported to that destination by means of vesicles. However, only the full form of LYT1s-EGFP was localized to the membrane, because this is the only form of the protein that contains a secretion signal sequence. These results showed that the different products of LYT1 present a differential localization pattern.

Exogenous expression of LYT1s-EGFP produces a defect in epimastigote motility

During the culture of the LYT1s-EGFP and LYT1n-EGFP parasites, changes in their movement compared to control EGFP and WT parasites were observed. Therefore, the pattern of movement and the trajectory of parasites by confocal fluorescence video-microscopy were analyzed, using the hanging drop technique, as described in the Methods section.

The EGFP parasites did not show any difference in growth and motility when compared to WT parasites, indicating that the expression of fluorescent protein

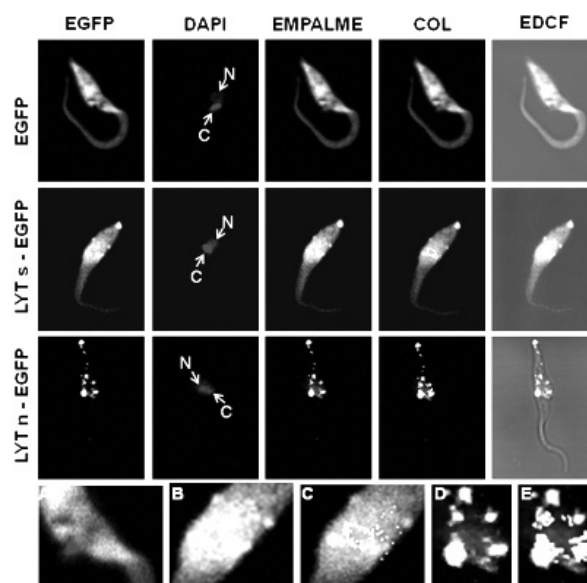


FIGURA 3. Análisis de la localización de EGFP, LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP en los epimastigotes transgénicos por microscopía confocal. Análisis de fluorescencia de las líneas estables de epimastigotes expresando EGFP y las proteínas quiméricas LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP. Los parásitos fueron teñidos con DAPI para visualizar el núcleo (N) y el cinetoplasto (C). Se muestra el empalme de las imágenes de EGFP y DAPI (EMPALME), la localización determinada con el programa LAS AF (COL) y el empalme, de EGFP, DAPI con el contraste de fase (EDCF). Se muestra una ampliación del empalme de EGFP y DAPI (donde se observa la combinación de los colores verde y azul observados como un color blanco azulado, que indica que hay colocalización) y del análisis con LAS AF (observada en color blanco, que indica que las moléculas detectadas se encuentran con una cercanía de aproximadamente 100 nm, lo que comprueba una colocalización positiva) en los parásitos EGFP (A), LYT1s-EGFP (B y C) y LYT1n-EGFP (D y E).

FIGURE 3. Analysis of the localization of EGFP, LYT1s-EGFP and LYT1n-EGFP in transgenic epimastigotes by confocal microscopy. Fluorescence analysis of stable lines of epimastigotes expressing EGFP, LYT1s-EGFP and LYT1n-EGFP chimeric proteins. Parasites were stained with DAPI to visualize the nucleus (N) and kinetoplast (C). Merge of EGFP and DAPI images (MERGE). The localization was determined with LAS AF (COL) software and the merge of EGFP, DAPI and phase contrast (EDCF). An amplification of EGFP and DAPI merge is shown (where the combination of green and blue colors appears bluish white, which indicates positive colocalization) and analysis with LAS AF (seen in white, indicating that molecules are detected with a proximity of about 100 nm, which confirms a positive colocalization) in parasites expressing EGFP (A), LYT1s-EGFP (B and C) and LYT1n-EGFP (D and E).

tigo), por inmunotransferencia, usando el anticuerpo α -GFP.

En la Figura 2 se muestra el reconocimiento del anticuerpo en bandas con los pesos moleculares esperados de 26 kDa para los parásitos EGFP (carril 1) y aproximadamente 82 kDa para LYT1ps-EGFP (carril 2) y 86 kDa para LYT1pn-EGFP (carril 3). No fue posible detectar la separación de las bandas de 82 kDa y 86

had no deleterious effects on the parasite and allowed the use of EGFP parasites as control in the following experiments. As shown in Figure 4, EGFP parasites showed vigorous movement and directionally, traveled short and long distances (panel A). By contrast, parasites expressing exogenous LYT1s-EGFP protein showed a dramatic deficiency in motility, only traveling short distances (panel B). The observation and analysis of these videos showed that this deficiency was characterized by slow and uncoordinated movement of the parasites that resulted in a shaky appearance of epimastigotes. The transfected parasites were also incapable of coordinating their flagellar movement, spinning out of control at the same site; this resulted in a noticeable difficulty in directional motility, although they had not lost their ability to move. In the case of LYT1n-EGFP parasites, a mixture of behaviors (panel C) was observed, where some parasites moved vigorously and traveled long distances in a manner comparable to that observed in control EGFP epimastigotes, while others showed the same phenotype as LYT1s-EGFP parasites.

Since exogenous expression of EGFP did not produce any deleterious effects, these results suggested that the exogenous expression, at least of the full form of LYT1 in the LYT1s-EGFP parasite, is responsible for the observed failure in motility. Future studies, as well as quantitative, vectorial and statistical analysis, will be necessary to determine whether the observed motility defect in LYT1n-EGFP parasites is significantly different with respect to control parasites, and to determine the alterations in speed and rotational angle that could be occurring in LYT1s-EGFP and LYT1n-EGFP parasites.

Discussion

The trypanosomatids, such as *T. cruzi*, have the unique ability to produce polycistronic transcripts that require 5' trans-splicing and 3' polyadenylation processing to obtain mature transcripts. Therefore, the main level of gene regulation occurs at the post-transcriptional level and makes it possible to obtain alternative products from a single copy gene with different functionality.¹⁰

This behavior has been reported for LYT1, the molecule studied in this paper, which is a protein with lytic activity under acidic conditions that participates in the infection and stage transition processes of *T. cruzi*.³ This different functionality is the result of the production of three different transcripts obtained by alternative trans-splicing, two of which encode a full protein that contains both an amino-terminal signal sequence and a nuclear sequence that differ only in the 5' untranslated sequence, as well as another that encodes a trun-

kDa debido a que no lo permite la resolución del sistema. Como era de esperarse, no hubo reconocimiento del anticuerpo en parásitos WT (dato no mostrado). Estos resultados indican que los parásitos LYT1s-EGFP, LYT1n-EGFP y EGFP expresan las proteínas exógenas y demuestran la generación exitosa de las líneas estables.

Las proteínas de LYT1, completa y truncada, presentan un patrón de localización diferente

Para determinar la localización de los diferentes productos de LYT1 en los epimastigotes transfectados, se evaluó la localización de EGFP como una medición indirecta de la presencia de LYT1s y LYT1n fusionados a EGFP, por microscopía confocal.

Como se observa en la Figura 3, el análisis de microscopía de fluorescencia de los epimastigotes EGFP mostró que la proteína verde fluorescente exógena se encuentra distribuida en todo el parásito. Como se esperaba, cuando se analizó el empalme de la fluorescencia de EGFP y de la tinción del núcleo y cinetoplasto con DAPI, no se observó colocalización. Por otro lado, mientras que los parásitos LYT1s-EGFP presentaron la fluorescencia en núcleo, cinetoplasto, flagelo, vesículas y membrana, los parásitos LYT1n-EGFP mostraron la fluorescencia preferentemente en núcleo y cinetoplasto, aunque en algunas ocasiones también se observó en vesículas. Estos resultados mostraron que ambos productos comparten la misma localización en núcleo, cinetoplasto y vesículas, lo que no es sorprendente, ya que comparten la secuencia de localización nuclear y se espera que sean transportados a su destino por medio de vesículas. Sin embargo, únicamente la forma completa de LYT1s-EGFP se localizó en membrana, ya que ésta es la única forma de la proteína que contiene una secuencia señal de secreción. Estos resultados mostraron que los diferentes productos de LYT1 presentan un patrón de localización diferencial.

La expresión exógena de LYT1s produce un defecto en la motilidad de los epimastigotes

Durante el cultivo de los parásitos LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP, se observaron cambios en su movimiento comparado con los parásitos testigo EGFP y WT. Por lo tanto, se analizó el patrón de movimiento y la trayectoria de los parásitos por video-microscopía de fluorescencia confocal, utilizando la técnica de gota suspendida, como se describe en la sección de métodos.

Los parásitos EGFP no mostraron ninguna diferencia en crecimiento y motilidad con respecto a los

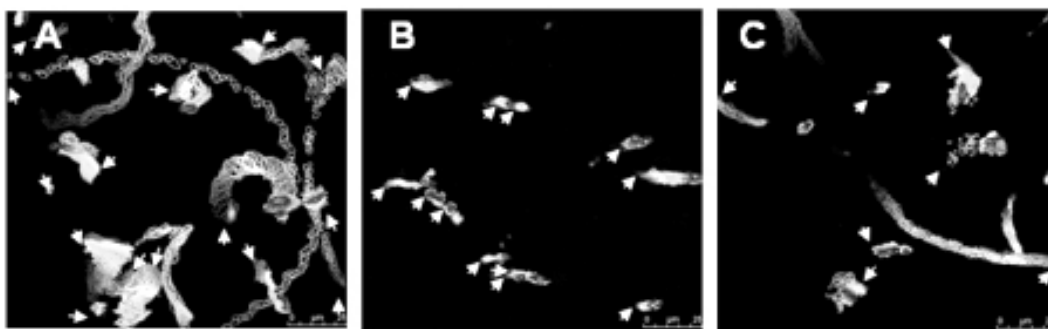


FIGURA 4. Análisis cuantitativo del movimiento de epimastigotes transgénicos por video microscopía confocal. Trayectoria de motilidad de parásitos expresando EGFP (A), LYT1s-EGFP (B) y LYT1n-EGFP (C). Las Flechas indican el inicio del registro de la trayectoria del parásito.

FIGURE 4. Quantitative analysis of the transgenic epimastigote motility by video confocal microscopy. The motile trajectory of parasites expressing EGFP (A), LYT1s-EGFP (B) and LYT1n-EGFP (C). Arrows indicate the start of the track recording of the parasite.

cated protein containing only the nuclear sequence.⁵ These transcripts are regulated throughout the different developmental stages of *T. cruzi*; the full protein is mainly expressed in trypomastigote and amastigote stages, and the truncated protein expressed in epimastigotes. This suggests that the differential expression of the protein may have implications in the biology of each of the developmental stages of the parasite.⁵

Since the different *LYT1* transcripts encode proteins with different localization sequences, the possible different localization of the full and truncated *LYT1* proteins was evaluated in this study. To do this, transgenic parasites that exogenously express different *LYT1* products fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) were obtained and their expression (Figure 2) and localization (Figure 3) in transfected epimastigotes of *T. cruzi* was evaluated indirectly. Fluorescence microscopy analysis of epimastigotes expressing exogenous full protein (LYT1s-EGFP) demonstrated its presence in the nucleus, kinetoplast, vesicles and membrane, while those parasites expressing truncated protein (LYT1n-EGFP) showed fluorescence preferably in the nucleus and kinetoplast, and occasionally in vesicles. These results indicate that different products of *LYT1* have different localization patterns. Another research group found similar results when they expressed an exogenous copy of sequences that encode the full or truncated *LYT1* protein in null parasites, also demonstrating the differential reconstitution of each phenotype.¹¹ The full protein was localized in the membrane, was secreted and sometimes was found in the kineto-flagellar region, and reconstituted the lytic and infectivity phenotypes of the parasite. Alternatively, the truncated protein was localized in the kineto-flagellar adjacent region and reconstituted the stage differentiation phenotype, demonstrating that each product of *LYT1* is involved in different

parásitos WT, lo que indicó que la expresión de la proteína fluorescente no tiene un efecto deletéreo y permitió utilizar a los parásitos EGFP como testigo en los subsiguientes experimentos. Como se muestra en la Figura 4, los parásitos EGFP mostraron un movimiento vigoroso y se desplazaron tanto distancias cortas como largas de manera direccional (panel A). Por el contrario, los parásitos que expresan a la proteína exógena LYT1s-EGFP presentaron una deficiencia dramática en su motilidad, desplazándose únicamente a distancias cortas (panel B). La observación y análisis de los videos mostró que esta deficiencia se caracterizó por un movimiento lento y descoordinado, dando una apariencia temblorosa a los epimastigotes. Además, presentaron incapacidad para coordinar su movimiento flagelar, girando de manera descontrolada sobre el mismo sitio, lo que resultó en una notoria dificultad en la motilidad direccional del parásito, aunque no perdieron su capacidad de moverse. En el caso de los parásitos LYT1n-EGFP, se observó una mezcla de comportamientos (panel C), ya que algunos parásitos se movían vigorosamente y recorrieron distancias grandes de manera comparable a lo observado en los epimastigotes testigo EGFP, mientras que otros mostraron un fenotipo similar a los parásitos LYT1s-EGFP.

Ya que la expresión exógena de EGFP no produjo ningún efecto deletéreo, estos resultados sugieren que la expresión exógena, al menos de la forma completa de *LYT1* en los parásitos LYT1s-EGFP, es responsable de la falla observada en la motilidad. Será necesario realizar estudios futuros, tanto cuantitativos como de análisis vectorial y estadístico, para determinar si el defecto observado en los parásitos LYT1n-EGFP es significativamente diferente con respecto a los parásitos testigo, y determinar las alteraciones en la velocidad y ángulo de rotación que pudieran estarse dando en los parásitos LYT1s-EGFP y LYT1n-EGFP.

functions.¹¹ The results of this study agree with previous findings, but in addition to the membrane and kinetoplast localization of LYT1s and the kinetoplast localization of LYT1n, two forms of the protein in the nucleus and vesicles were observed. This result is not surprising, since both the full and truncated protein contain a nuclear localization sequence and could be carried to their final destinations via vesicle transport.

One possible explanation for these differences is that the close proximity of the nucleus and kinetoplast in the epimastigote cannot clearly distinguish the localization of these proteins in both organelles. The possibility that the fusion of LYT1 with EGFP could de-localized LYT1 is another possibility. However, this effect is unlikely, since it has been reported that this reporter gene does not typically change the localization of the protein with which it is fused.^{12,13} Furthermore, the observed localization corresponds to that which was reported for the endogenous proteins, making it unlikely to obtain additional aberrant localization in addition to the localization of endogenous LYT1, although further experiments are needed to test these possibilities.

An interesting and unexpected phenotype was that the exogenous expression of LYT1-EGFP affected the movement of parasites. The epimastigote motility depends essentially on the flagellum that is formed mainly from microtubules.¹⁴⁻¹⁷ Even though there are known molecules that are involved in the movement of flagellum in eukaryotic cells, very little is known about the mechanism that regulates or coordinates this flagellar movement.¹⁸ Microtubules play an important role in maintaining the structure of *T. cruzi* and are involved in the separation of basal bodies, in the growth of new flagellum, in mitosis, in cytokinesis and, in parasite motility.^{14,16,19} These proteins also constitute the flagellar pocket, the site of endocytosis and exocytosis of the proteins, an important organelle in the regulation of vesicular traffic that carries molecules necessary for growth and function of the flagellum.²⁰⁻²²

The LYT1 null parasites³ and the dominant-negative mutant of LYT1⁶ did not present defects in parasite motility. Therefore, these results suggest that the LYT1 protein potentially indirectly participates in flagellar movement of the epimastigotes, likely through its interaction with other proteins that are involved in the motility of the parasite.

This hypothesis is supported by the results of this study, which show that LYT1-EGFP transfected parasites behave as dominant-negative mutants of some of the protein(s) that are involved in motility of the parasite and attach to LYT1. This proposal is supported by analysis of molecules that could potentially interact with LYT1, such as tubulin, kinesins and dynein, which are molecules that are involved in vesicular traffic of

Discusión

Los tripanosomatidos, como *T. cruzi*, tienen la característica particular de producir transcritos policistrónicos que requieren de un procesamiento de trans-empalme 5' y poliadenilación 3' para su procesamiento y obtención de transcritos maduros. Esto resulta en que el principal nivel de regulación de su expresión sea pos-transcripcional y que sea posible la obtención de productos alternativos con diferente funcionalidad a partir de un mismo gen.¹⁰

Este comportamiento ha sido reportado para LYT1, que es la molécula en estudio en este trabajo de investigación, la cual es una proteína con actividad lítica en condiciones ácidas, que participa en el proceso de infección y transición de estadio de *T. cruzi*.³ Esta diferente funcionalidad es resultado de la producción de tres transcritos distintos obtenidos por trans-empalme alternativo. Dos de los cuales codifican para una proteína completa que contiene tanto una secuencia señal amino-terminal como una secuencia nuclear y que difieren únicamente en su secuencia no traducida 5'. Y otro que codifica para una proteína truncada con únicamente la secuencia nuclear.⁵ Estos transcritos son regulados en los distintos estadios de desarrollo de *T. cruzi*, expresándose mayoritariamente los que codifican para la proteína completa en tripomastigote y amastigote y para la proteína truncada en epimastigotes, lo que sugiere que posiblemente su expresión diferencial pudiera tener implicaciones en la biología de cada uno de los estadios de desarrollo del parásito.⁵

Ya que los diferentes transcritos de LYT1, codifican para proteínas con distintas secuencias de localización, en este trabajo se evaluó la posible localización diferencial de la proteína completa y truncada de LYT1. Para ello se obtuvieron y caracterizaron parcialmente parásitos transgénicos que expresan de manera exógena los diferentes productos de LYT1 fusionados a la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) y, de manera indirecta, su expresión (Figura 2) y localización (Figura 3) en epimastigotes de *T. cruzi*. El análisis de microscopía de fluorescencia de los epimastigotes que expresan a la proteína completa (LYT1s-EGFP) demostró su presencia en núcleo, cinetoplasto, vesículas y membrana, mientras que los que expresan a la proteína truncada (LYT1n-EGFP) mostraron la fluorescencia preferentemente en núcleo y cinetoplasto y ocasionalmente en vesículas. Estos resultados indican que los diferentes productos de LYT1 tienen patrones de localización distintos. Otro grupo de investigación obtuvo resultados similares, expresados de manera exógena en la proteína completa o truncada de los parásitos nulos de LYT1 y demostrados en la reconstitución diferencial de los distintos fenotipos.¹¹ La pro-

parasite.²³ Since this mechanism is essential for the transport of molecules responsible for the growth and function of the flagellum, its disruption could alter cellular motility. Therefore, if expression of exogenous LYT1-EGFP and its interaction with tubulin, dynein and kinesins, are affecting the efficiency of intra-flagellar transport and therefore the proper functioning of any of the molecules necessary for movement of the flagellum, it would be possible to obtain a deleterious phenotype such as the one observed in transfected parasites.^{24,25}

The alternative expression and differential switch in localization and function of different LYT1 products could reflect the optimization of biological systems to perform diverse functions from a single gene, as has been reported for other molecules in different biological systems, such as trypanosomatids,^{11,26,27} plants^{11,28,29} and higher eukaryotes.³⁰

This study widens knowledge of the molecular mechanisms involved in the regulation of expression and infection processes of *T. cruzi* and also provides information that helps understand parasite biological processes necessary for establishment of Chagas disease.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT grants number 42862 and 60152 that were awarded to Rebeca G. Manning-Cela and by Fogarty International Center of NIH number R01 TW007255-01, CONACyT number 47543-3 and PAPIIT number IN203606 awarded to Santiago Martínez-Calvillo. During the course of this work, Gilberto Ballesteros-Rodea received a doctoral fellowship (number 116226) from CONACyT. Special thanks to Ivan Galvan for his technical support in the use of the confocal microscope and Victor Rosales in the use of FACS.

Referencias

1. BARRET MP, BURCHMORE RJ, STICH A, LAZZARI JO, FRASH AC, CAZZULO JJ *et al.* The trypanosomiasis. Lancet 2003; 362: 1469-1480.
2. ESPINOZA GB, MANNING-CELA RG. An overview of mammalian cell infection immunology of parasitic diseases. Kerala, India 2007; 291-311.
3. MANNING-CELA R, CORTES A, GONZALEZ-REY E, VAN VOORHIS WC, SWINDLE J, GONZALEZ A. LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 2001; 69: 3916-3923.
4. CALER EV, VAENA DE AVALOS S, HAYNES PA, ANDREWS NW, BURLEIGH BA. Oligopeptidase

teína completa se localizó en membrana, fue secretada y en algunas ocasiones se observó en la región cinetoflagelar, y reconstituyó el fenotipo lítico y de infectividad. Por otro lado, la proteína truncada se localizó en la región adyacente cinetoflagelar y reconstituyó el fenotipo de diferenciación de estadio, demostrando que cada producto de LYT1 está implicado en funciones distintas.¹¹ Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo anterior, aunque además de la localización en membrana y cinetoplasto de LYT1s y en cinetoplasto de LYT1n, se observaron ambas formas de la proteína en núcleo y vesículas. Este resultado no es sorprendente, ya que tanto la proteína completa como truncada contienen una secuencia de localización nuclear y podrían ser llevadas a sus destinos finales por medio de vesículas de transporte.

Una posible explicación a estas diferencias es que la estrecha cercanía del núcleo y cinetoplasto en el epimastigote no permite distinguir claramente la localización en ambos organelos. La posibilidad de que la fusión de LYT1 con EGFP pueda, de alguna manera, des-localizar a LYT1 es otra posibilidad. Sin embargo, se piensa que ello es poco probable, ya que se ha informado que este gen reportero por lo regular no modifica la localización de las proteínas a las cuales se fusiona.^{12,13} Además, la localización que se observó corresponde a la que se registró para la proteína endógena, siendo poco probable que se obtuviera una localización aberrante adicional a la localización de LYT1 endógena, aunque serán necesarios futuros experimentos para comprobar estas posibilidades.

Un fenotipo interesante e inesperado fue que la expresión exógena de LYT1-EGFP afectó el movimiento de los parásitos. La motilidad del epimastigote depende esencialmente del flagelo, el cual está conformado principalmente de microtúbulos.¹⁴⁻¹⁷ A pesar de que se conocen algunas moléculas involucradas en el movimiento del flagelo en células eucariotas, es muy poco lo que se sabe sobre el mecanismo que regula o coordina este movimiento flagelar.¹⁸ Los microtúbulos tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura de *T. cruzi*, participa en la separación de los cuerpos basales, en el crecimiento del nuevo flagelo, en la mitosis, en la citocinesis y por supuesto en la motilidad del parásito.^{14,16,19} También éstos conforman el saco flagelar que es por donde el parásito endocita y exocita sus proteínas, siendo un organelo importante en la regulación del tráfico vesicular que lleva las moléculas necesarias para el crecimiento y funcionamiento del flagelo.²⁰⁻²²

Los parásitos nulos de LYT1³ y la mutante dominante negativa de LYT1⁶ aparentemente no presentan defectos en la motilidad del parásito. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la proteína LYT1 tiene posiblemente una participación indirecta en el movi-

- B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 1998; 17: 4975-4986.
5. MANNING-CELA R, GONZALEZ A, SWINDLE J. Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2002; 70: 4726-4728.
 6. MANNING-CELA R, SWINDLE J. Obtención y análisis de una mutante dominante negativa de LYT1 de *Trypanosoma cruzi*. *Siicsalud*. [Serie en línea: 2003 agosto 2003] [Citado: 2003 agosto 6]; Disponible en: www.siicsalud.com/des/des032/03805024.htm.
 7. CAMARGO EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Instit Med Trop Sao Paulo* 1964; 12: 93-100.
 8. VAZQUEZ MP, LEVIN MJ. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 1999; 239: 217-225.
 9. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
 10. MARTINEZ-CALVILLO S, VIZUET-DE-RUEDA JC, FLORENCIO-MARTINEZ LE, MANNING-CELA RG, FIGUEROA-ANGULO EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 525241.
 11. BENABDELLAH K, GONZALEZ-REY E, GONZALEZ A. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Mol Microbiol* 2007; 65: 1559-1567.
 12. TSIEN RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-544.
 13. YANG F, MOSS LG, PHILLIPS GN, JR. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1246-1251.
 14. GULL K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 629-655.
 15. HUTCHINGS NR, DONELSON JE, HILL KL. Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. *J Cell Biol* 2002; 156: 867-877.
 16. KOHL L, GULL K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93: 1-9.
 17. KOHL L, BASTIN P. The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol* 2005; 244: 227-285.
 18. COSSON MP, COSSON J, ANDRE F, BILLARD R. cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility: their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 31: 159-176.
 19. ROBINSON DR, SHERWIN T, PLOUBIDOU A, BYARD EH, GULL K. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J Cell Biol* 1995; 128: 1163-1172.
 20. BROOKS DR, TETLEY L, COOMBS GH, MOTTRAM JC. Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. *J Cell Sci* 2000; 113: 4035-4041.

miento flagelar de los epimastigotes, probablemente a través de su interacción con otras proteínas que participan en el proceso de motilidad del parásito.

Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que nuestros resultados muestran que los parásitos transfectados LYT1-EGFP se comportan como mutantes dominantes negativas de alguna(s) proteína(s) que participa(n) en la motilidad del parásito y que se une a LYT1. Esta propuesta se basa en el hecho de que cuando se analizaron las moléculas que interactúan con LYT1 se encontró que se une a tubulina, cinesina y dineina, que son moléculas involucradas en el tráfico vesicular del parásito.²³ Ya que este mecanismo es esencial para el transporte de las moléculas encargadas del crecimiento y buen funcionamiento flagelar, podría ser alterada la motilidad celular. Por lo tanto, si la expresión exógena de LYT1-EGFP y su interacción con tubulina, dineina y cinesina, están afectando la eficiencia del transporte intra-flagelar y por lo tanto el funcionamiento correcto de cualquiera de las moléculas necesarias para el movimiento del flagelo, sería posible obtener un fenotipo deletéreo como el observado en los parásitos transfectados.^{24,25}

La expresión alternativa, cambio de localización y función diferencial de los productos de LYT1, podrían reflejar la optimización de los sistemas biológicos para cumplir con diversas funciones a partir de un único gen, como se ha reportado para otras moléculas en diferentes sistemas biológicos como tripanosomatidos,^{11,26,27} plantas^{11,28,29} y eucariontes superiores.³⁰

Este estudio permite entender de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión e infección de *T. cruzi* y proporciona información que ayuda a entender los procesos biológicos del parásito, necesarios para el establecimiento de la enfermedad de Chagas.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos de CONACyT No. 42862 y 60152 otorgado a Rebeca G. Manning-Cela, y de Fogarty International Center of NIH No. R01 TW007255-01, CONACyT No. 47543 y PAPIIT IN203606-3 otorgado a Santiago Martínez-Calvillo. Durante el desarrollo de este trabajo, Gilberto Ballesteros-Rodea recibió la beca doctoral de CONACyT No. 116226. Se agradece a Iván Galván el apoyo técnico en el uso del microscopio confocal y a Víctor Rosales en el uso del FACS.

21. KOZMINSKI KG, JOHNSON KA, FORSCHER P, ROSENBAUM JL. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5519-5523

22. SOUTO-PADRON T, CAMPETELLA OE, CAZZULO JJ, DE SOUZA W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci* 1990; 96: 485-490.
23. LUGO-CABALLERO CI. Identificación de complejos proteicos de *Trypanosoma cruzi* asociados a LYTIp (tesis de maestría). Departamento de Biomedicina. México DF: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 2008.
24. ROSENBAUM JL, WITMAN GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 813-825.
25. KOHL L, ROBINSON D, BASTIN P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J* 2003; 22: 5336-5346.
26. CHAMOND N, GREGOIRE C, COATNOAN N, ROUGEOT C, FREITAS-JUNIOR LH, DA SILVEIRA JF *et al*. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem* 2003; 278: 15484-15494.
27. ENGEL ML, HINES JC, RAY DS. The *Crithidia fasciculata* RNH1 gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms of RNase H. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 725-731.
28. WAMBOLDT Y, MOHAMMED S, ELOWSKY C, WITTGREN C, DE PAULA WB, MACKENZIE SA. Participation of leaky ribosome scanning in protein dual targeting by alternative translation initiation in higher plants. *Plant Cell* 2009; 21: 157-167.
29. SILVA-FILHO MC. One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* 2003; 6: 589-595.
30. CHEN HH, LUCHE R, WEI B, TONKS NK. Characterization of two distinct dual specificity phosphatases encoded in alternative open reading frames of a single gene located on human chromosome 10q22.2. *J Biol Chem* 2004; 279: 41404-41413.