

LA CRUZIPAINA, CISTEINA PROTEINASA PRINCIPAL DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*

SECUENCIA Y ORGANIZACION GENOMICA DE LOS GENES QUE LA CODIFICAN

JUAN JOSE CAZZULO*

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, San Martín, Provincia de Buenos Aires

Resumen La cruzipaina es la cisteína proteinasa principal del parásito causante de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. La enzima está codificada por un número grande de genes (hasta 130 en la cepa Tul 2) dispuestos en tandem cabeza-cola, y ubicados en dos a cuatro cromosomas diferentes, según el clon o cepa del parásito. La expresión simultánea de varios genes diferentes lleva a la producción de una mezcla compleja de isoformas. Las isoformas englobadas en el término "cruzipaina 1" difieren esencialmente en el dominio C-terminal, en su secuencia de aminoácidos y en su patrón de N-glicosilación. Se ha determinado la presencia de una forma que difiere más marcadamente, particularmente en la región catalítica, la cruzipaina 2.

Abstract *Cruzipain, major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: sequence and genomic organization of the codifying genes.* Cruzipain is the major cysteine proteinase present in *Trypanosoma cruzi*, the parasite causing the American Trypanosomiasis, Chagas disease. The enzyme is encoded by a high number of genes (up to 130 in the Tul 2 stock) placed in head-to-tail tandems, and located in two to four chromosomes. The simultaneous expression of several different genes results in the production of a complex mixture of isoforms. Those known as a group as "cruzipain 1" differ essentially at the level of the C-terminal domain, in their aminoacid sequence and in their type of N-glycosylation. The existence of a more distantly related cysteine proteinase, "cruzipain 2", has been demonstrated; it differs markedly, particularly at the level of the catalytic moiety.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, cysteine proteinase, cruzipain

Todas las células eucarióticas poseen un conjunto de actividades de peptidasas, incluyendo tanto endopeptidasas o proteinasas, como exopeptidasas¹. Sus funciones son muchas, y van desde la digestión de proteínas endocitadas con fines nutricionales, hasta el procesado de proteínas a través de una proteólisis limitada y muy específica, que lleva a la producción de las proteínas funcionales maduras. En el caso de las células de mamífero, la variedad de actividades proteolíticas presentes es apreciablemente mayor que la que se encuentra en células de eucariotes inferiores, y en éstas es, a su vez, mayor que la presente en procariotes. La universalidad de estas enzimas se observa en el hecho de que aún ciertos virus poseen proteinasas específicas, que les sirven para el procesamiento de la poliproteína en que se expresa primariamente el genoma viral¹.

El *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas, es un flagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida. Como en otros miembros de la familia Trypanosomatidae, se encuentran proteinasas pertenecientes a cuatro de las clases principales, a saber cisteína proteinasas, que son las más abundantes, serina proteinasas, metaloproteinasa y treonina proteinasas (el proteasoma)². Las cisteína proteinasas informadas hasta el presente corresponden esencialmente al Tipo I según la clasificación de Coombs y Mottram³, que se caracteriza por presentar una extensión C-terminal, si bien recientemente se ha clonado el gen que codifica una catepsina de tipo B, correspondiente al Tipo III⁴.

La cruzipaina^{5, 6} es una cisteína proteinasa lisosomal (aunque hay también localización de algunas isoformas minoritarias en la membrana plasmática⁷), presente en los epimastigotes a una concentración apreciablemente mayor que en los otros estadios del parásito. Se trata de una glicoproteína del tipo de alta manosa, con un peso molecular aproximado de 41 kDa. La enzima está codificada por un número particularmente grande de genes (130 en la cepa Tul 2), colocados en serie y separados

* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Hasta el presente no se han detectado genes de cruzipaína con un dominio C-terminal diferente que permita predecir la sustitución de su extremo por un ancla de glicosil fosfatidil inositol; es probable que las isoformas de membrana⁷ se encuentren ligadas de esa manera. Se ha demostrado, en cambio, que el último gen de un tandem clonado y secuenciado por el grupo de J. Kelly en Londres, presenta un dominio C-terminal más corto y completamente diferente en secuencia¹⁰. Este gen, sin embargo, parece no expresarse, como tampoco se expresa el último gen de un tandem de cisteína proteinasas del Tipo I clonado de *Leishmania mexicana*³.

La cruzipaína es un antígeno reconocido por sueros de pacientes chagásicos crónicos; la gran mayoría de los anticuerpos presentes en estos sueros están dirigidos contra el dominio C-terminal y no contra el dominio catalítico, y son capaces de inmunoprecipitar a la enzima sin inhibir a su actividad proteolítica, al menos usando sustratos cromogénicos pequeños⁵.

Las funciones de la cruzipaína no están aún completamente definidas, pero incluirían: 1) la digestión lisosomal de proteínas, exógenas o del propio parásito; 2) la protección contra la respuesta inmune del hospedador, por destrucción del fragmento Fc de las inmunoglobulinas ligadas a los respectivos antígenos, lo que dejaría el fragmento F(ab')₂, incapaz de activar el complemento y que actuaría así como protector; 3) un papel en la penetración del trypomastigote en la célula del mamífero, pues se sabe que inhibidores de proteinasas inhiben parcialmente este proceso, 4) un papel en las etapas de diferenciación en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito. Estudios recientes de varios laboratorios, empleando inhibidores de cisteína proteinasas capaces de penetrar en el parásito^{11, 13}, indican claramente una participación importante de estas enzimas, entre ellas presumiblemente la cruzipaína¹³, en estos procesos. Estos estudios abren la posibilidad de desarrollar inhibidores de la cruzipaína como drogas antichagásicas.

Agradecimientos. Los trabajos realizados se efectuaron gracias a subsidios de CONICET, SECYT, SAREC/Sida (Suecia) y TDR/WHO.

Bibliografía

1. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds.) *Handbook of Proteolytic enzymes*. London: Academic Press 1998; pp 1-1666.
2. Cazzulo JJ. Chagas Disease. In *Proteases of Infectious Agents* (B. Dunn, Ed.) Academic Press Inc., San Diego, 1999; 189-203.
3. Coombs GH, Mottram JC. Proteinases of Trypanosomes and Leishmania. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis* (eds. Hide G, Mottram JC, Coombs GH and Holmes PH), CAB International. 1997; pp 177-97.
4. Nóbrega OT, Santos Silva MA, Teixeira ARL, Santana JM. Cloning and sequencing of *tccb*, a gene encoding a *Trypanosoma cruzi* cathepsin B-like protease. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 97: 235-40.
5. Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the Protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem (ex Hoppe-Seyler)* 1997; 378: 1-10.
6. Cazzulo JJ. Cruzipain. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner F, Eds.). Academic Press Inc., London 1998; Chapter 203, pp 591-3.
7. Parussini F, Duschak VG, Cazzulo JJ. Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Mol Biology* 1998; 44: 513-9.
8. Lima APCA, Tessier DC, Thomas DY, Scharfstein J, Storer AC, Vernet T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67: 333-8.
9. Martínez J, Henriksson J, Ridåker M, Pettersson U, Cazzulo JJ. Polymorphisms of the genes encoding cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, in the region encoding the C-terminal domain. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 159: 35-9.
10. Tomas AM, Kelly JM. Stage regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 76: 91-103.
11. Meirelles MNL, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta ACM, Scharfstein J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 52: 175-84.
12. Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 17-24.
13. Franke de Cazzulo BM, Martínez M, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. Effect of proteinase inhibitors on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 124: 81-6.