





LdPIBPnex, a secreted nexin-like protein from the protozoan parasite Leishmania donovani

Drosos Kourounis¹, Amalia Papadaki¹, Olympia Tziouvara¹, Haralabia Boleti^{1,2}

1. Intracellular Parasitism group, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece 2. Light Microscopy unit, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece

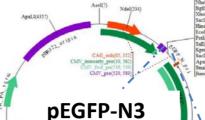
Introduction

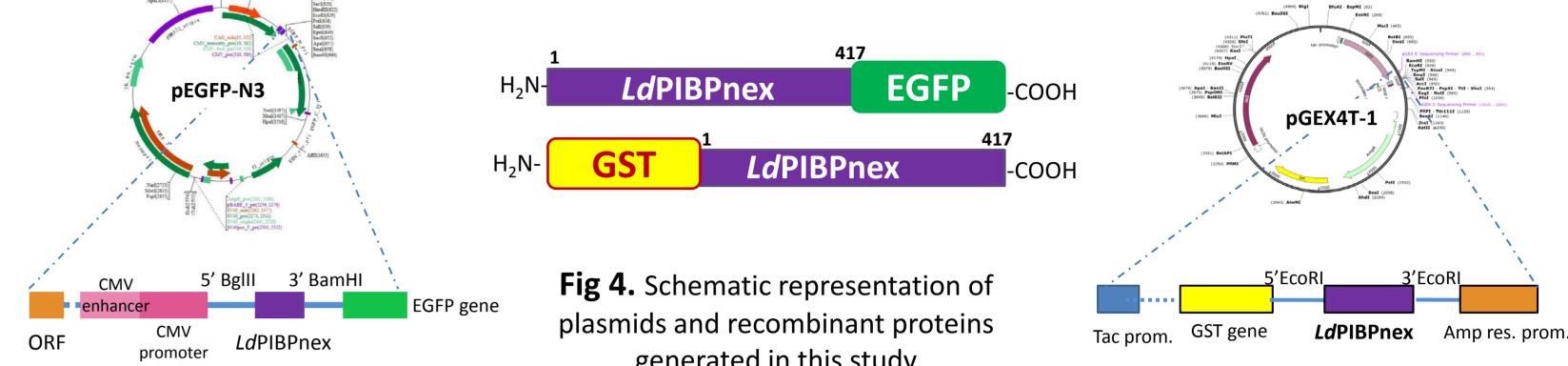
Leishmania donovani is a protozoan parasite that causes visceral leishmaniasis, a disease of the hematopoietic organs, which can be fatal if left untreated.

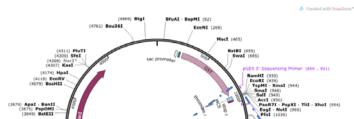
The parasite has two developmental forms, the promastigote, which lives and proliferates inside the sandfly host and the intracellular amastigote living in the phagocytes of the mammal host. The pathogen is transmitted to mammals through the bite of phlebotomine sandflies (Fig. 1) [1].

Cloning and Biochemical identification of *Ld***PIBPnex in**

L. donovani subcelllular protein fractions







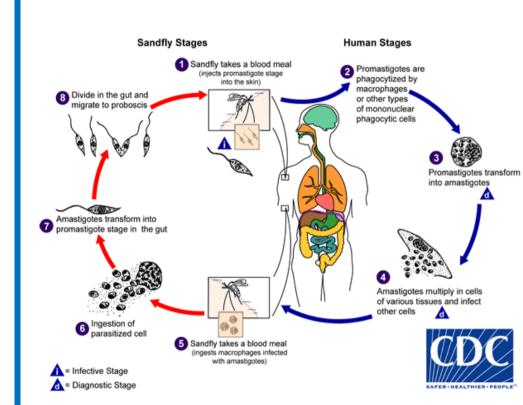


Fig. 1 : Life cycle of *L.donovani*.

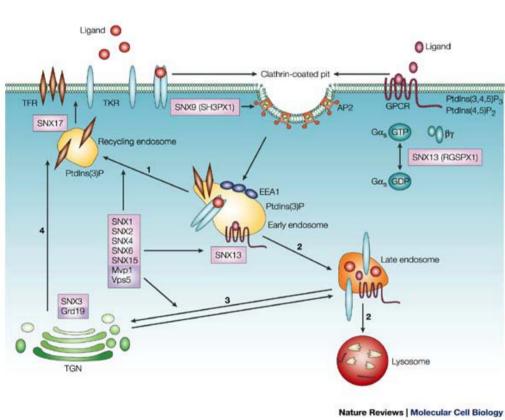
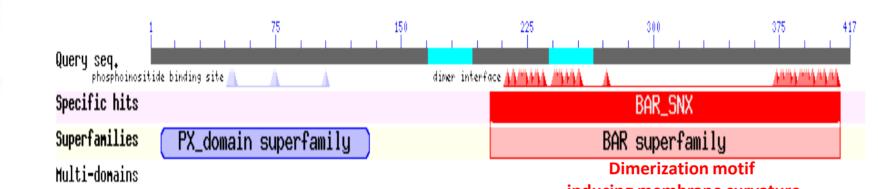


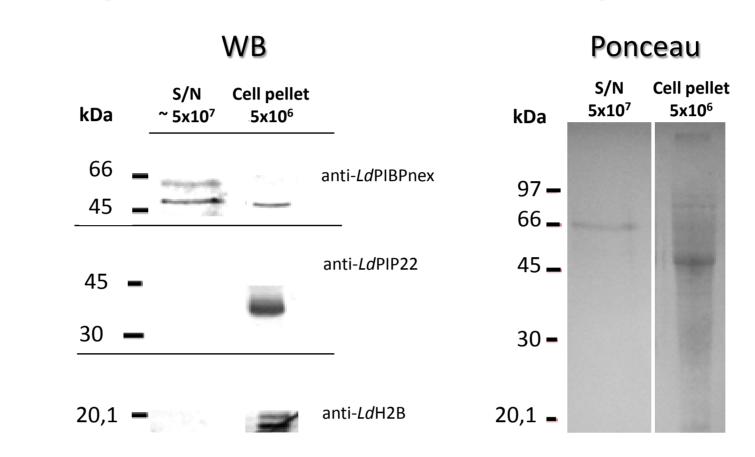
Fig. 3 : Molecular endocytic and sorting pathways regulated by the Leishmania and other intracellular pathogens have evolved strategies to invade and persist within the host target cells. In some cases the underlying mechanisms involve the export of virulence factors into the host cell cytosol [2].

Proteomic analysis of the secretome of Leishmania *donovani* revealed a highly secreted protein encoded by the LdBPK_352470.1 gene that is conserved in most Leishmania and Trypanosoma species. It's protein product is enriched in the extracellurar secreted fraction of a promastigote culture [3].

The LdBPK_352470.1 gene encodes for a **417 a.a** protein with predicted MW 46,6 KDa, a **PX** phosphoinositide binding domain and structural features that classify it in the Sorting Nexin (Fig. 2) [4] family of proteins. We named it LdPIBPnex, from Leishmania donovani Phosphoinositide Binding Protein nexin.



Analysis of Secreted L. donovani proteins



generated in this study

Kinetics of LdPIBPnex expression in L. donovani promastigote cell cycle

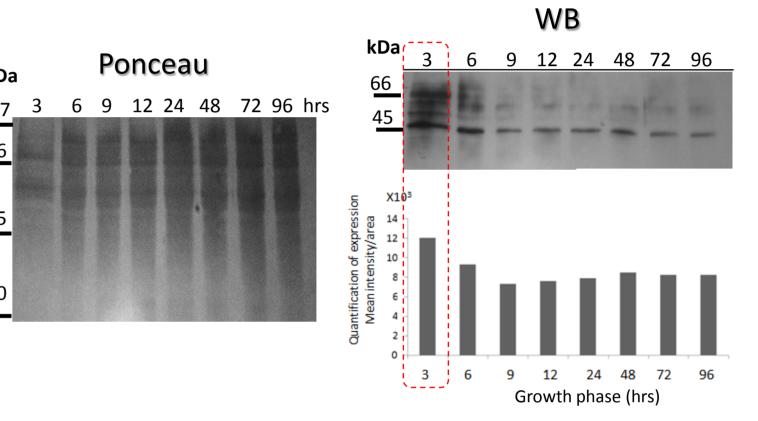
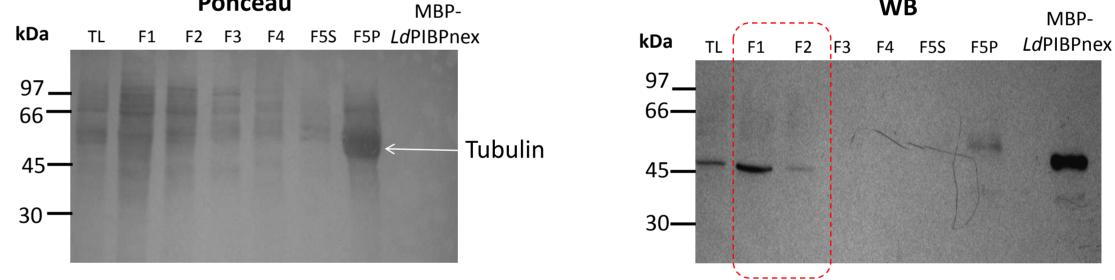


Fig. 5 : WB analysis of *L. donovani* proteins secreted at 25 °C for 6 hrs. The S/N containing secreted proteins was separated from the cells by a 2 step centrifugation (1000g, 10 min and 20.000 g, 20 min). Secreted proteins (S/N) were precipitated with acetone. Intracellular (cell pellet) and secreted proteins were detected by specific pAbs.

Fig. 6 : L. donovani lysates collected at specific time points during promastigote growth in cell culture were analyzed by SDS-PAGE (12% w/w) and WB, using specific rabbit a-LdPIBPnex pAb, for the presence and abudance of *Ld*PIBPnex

Identification of LdPIBPnex in L. donovani Subcellular fractions

			P	onc	eau		MBP-
kDa	TL	F1	F2	F3	F4	F5S	F5P <i>Ld</i> PIBPnex



presence of different Nexins.

Fig. 2: Predicted structural characteristics of *Ld*PIBPnex

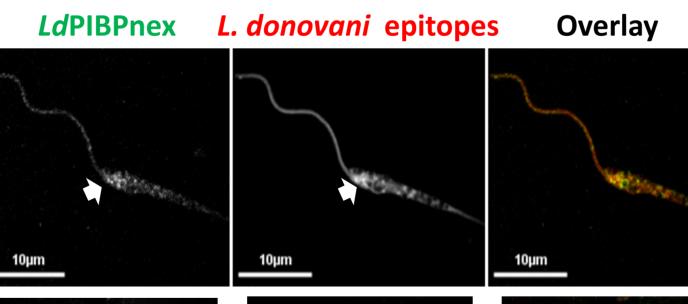
Nexins are a large group of cytoplasmic proteins with the potential to associate with membranes either through their lipid-binding PX domain or through protein-protein interactions with membrane-associated protein complexes. Members of this family have been shown to participate in clathrin-dependent and –independent endocytosis, as well as in an increasing array of endosomal sorting events (Fig. 3) [5].

Fig. 7 : L. donovani promastigotes at the stationary phase of growth were fractionated by resuspension in buffers containing gradually increasing concentration of digitonin (20 μM, 200 μM, 1 mM and 10 mM). Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE (12% w/v) and WB. Using a specific anti-LdPIBPnex rabbit pAb generated against the C-terminal half of LdPIBPnex produced in bacteria (i.e. MBP-LdPIBPnex-C-term), used here as positive control. Fractions F1 and F2 are enriched in soluble proteins, fractions F3-F5S are enriched in membrane proteins and F5P is enriched in cytoskeletal and nuclear proteins.

BLAST analysis of LdPIBPnex sequence

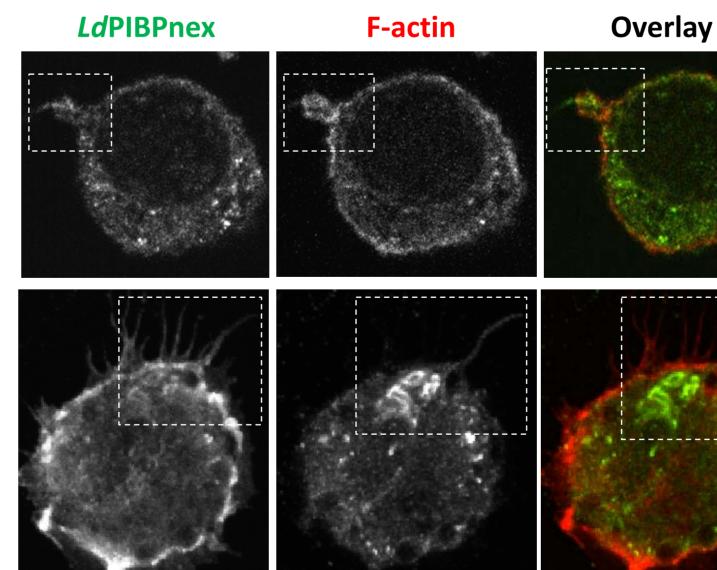
	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
	новессосовесных теслистся отламаетовановые совется маказа совется и различито совется и сталите совется и стали новессосовествая совется совется совется совется совется совется совется совется и сталите совется совется со новессосоведия совется совется новессосоведия совется сов совется совется с
	мессферсологосмфе
l	110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 FegestreeCreeCriteCondectTeaceAccondectAccondectAccondectAccondectAccondectAccondectAccondectAcconde
	$\label{eq:constructed} reconstructed construction of the the two the transformation of transformation $
	гесесттесствеститителеселгестретислиссессетисисселстителелистессессесси/прететеселистистесит гесесттессреститителеселгесреетислиссессетисисселстителелир.тесессессистетеселирилреетистесит
l	210 220 210 240 250 260 270 280 290 300
l	
	катессилсскитссци изключите собъеслиритилисторации и состосское собъесси и собъесси собъесси и катессилсскитс собъесси и собъесси и из полности и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и катессилсскитс собъесси и собъесси и из полности и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и катессилсти и собъесси и собъесси и из полности и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и катессился и поссии и собъесси и из полности и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и собъесси и катессился и поссии и катесси и собъесси и с катессился и поссии и катесси и собъесси и с
	310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
l	THE TO BE THE ADDRESS OF THE ADDRESS
	стестсемитисствотителествоевоестостесиесе полнотителение и полнотителение систе и расстисти коллоние и полнотите такателение и полнотителе строевое строетеление и полнотителение славателение и полнотителение и полнотителение стестсемитисется и сисстроевое строетеленое строетисствое славателение и полнотителение и полнотителение и полно такателение и полнотителе строевое строетеление и полнотителение славателение и полнотителение и полнотителение стестсемитисется и сисстроевое строетеленое строетисствое славателение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и стестсемитисется и сисстроевое строетеленое строетистиствое славателение и полнотителение и полнотите стветсемитисется и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотите стветсемитисется и полнотителение и полнотите стветсемитисется и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотителение и полнотите
	<u>410 430</u> 430 440 450 460 470 480 490 500
ł	италисальтессистиете стоералоссовтелля: сосстоя ит плователение в вызыклов солоние и состоя и пломентов соссавате стоералоссов с пловет сосстоя и плователение и составляет состоя и составляет состоя и пловет состоя и пло
	италовитеероссаетос споесиосовтелисосстоещети постостостостованелия посселение постоле постоле и посси и посто постоле посто п
	ATAACGAGTGGCCCCAGTGCACCGGGCACCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGCCACGGC
	510 530 530 530 540 550 560 570 580 590 600
i	CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOCTOCCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOCTOCCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOCTOSCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOCTOSCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOCTOSCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSOCCOSTINCTANSET ASCOSTOSCOSTOSCOSOSSTOSTOSCO CARTOCINTOSCOSTOSCOSTOSCOSTOSCOSTOSCOSTOSCOSOS
	610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 FARECRATERATERAGEORACEARCONCETERACTORISTIC TARCTCARER_CARECOCARCENTCARED
	ENECCAFIENTIANDECEMENTE CONCERCING AND A
	амессиятеели вывеселсетеемеесе Писклессият и ситтеетемстеелетит лиссти слава Писклессия стерина вмессиятеели в месселсетеемеесе салассоват и ситтеетемстеелетит лиссти слава Писклессия стистеемее солости сте вмессиятеели в Проводателение солосоват и ситтеетемстеелетит лиссти слава Писклессия стистееме вмессиятеели в Проводателе Силаесе в солосоват и ситтеете востеелетит лиссти слава Писклессия стистееме вмессиятеели в Проводателе Силаесе в солосовати ситтеете востеелетите лиссти слава Писклессия стистееме вмессиятеели в Писклессия с поста с поста в солосовати с поста в солосоватие с солосоте с поста в солосоватие в соста с поста в солосоватие с солосоватие с поста в солосоватие с с с с с с с с с с с с с с с с с с с
	710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
j	атсебсассессоссосстссессетелесалсттВссесстстттВеестесттессбалебсельзанелесселестессесссссатсел атсебсассессоссосстссессетелесалсттВссесстсттттвеестесттессбалебсельзанелистессоссессссатсел
	ATCHERACCEGECCECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
	810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
j n	heegetececenctecegeteechangeteechangetetrangechangeneeringegeterengegetetetracscoordinangettitacsteget
	hesested consistences and the construction of
	910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
i	ATGTGTGCCGCCCGTGCGGGAGACTCTG72CCACATGTTCACCGCCCCCCCCAGTATCTGCCGCAACTTGCCAGAAGAAGGGCCCAGGAACTGCCAGGCGTCGGCGA
ì	atetetecceccetecceerabatchcatettcreeccceccecratatcteccerabaterabageccreerabcteccecceerabageceraberabceccecce atetetecceccetecceerabactcterabceccecceccatetatcteccerabaterabageccreerabceccecceerabaterabageccreerabateraberab betetetetetecerabaterabaterabeterabeterabeterabeterabeterabaterabaterabaterabeterabeterabeterabeterabeterabeterab
	атететесПровытессвелалетствальтся сатегтся всессоссосся в тактоте составляет на волоситеся в на волосите соста на тетете составляется в на волосите и смерсососся в тактоте составляется в на волоситеся в на волосите составля
l D	TECEGEGENCHETCCGCCCAACCRGETECREETECREGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGEGE
n	тесевссислятевссилосилетесяетесяенсевлестесясттятевителесяесеесссисстсевлевлюетсителевсессевели тесевссислятсевссилосилетесяевсиеваесевестесяюттвэтелителесяесевсессисстсевлевлейсстситевесессевели тесевссисляв веродиссилетесяевтеслей ревестесяюттетелителесяесевсессосстсевлевлейсстситевесессевели
r	тесярсделятсяесярыссалаетесялетесялетесялетесялеттегальтельсолесовесссилстралаенарысстсатрасеосовалы
L	1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

Localization of *Ld*PIBPnex in L. donovani promastigotes





Localization of *Ld*PIBPnex epitopes in infected J774 macrophages with L. donovani promastigotes



Heterologous expression of LdPIBPnex-GFP in HeLa cells

Overlay LdPIBPnex-GFP **F-actin**

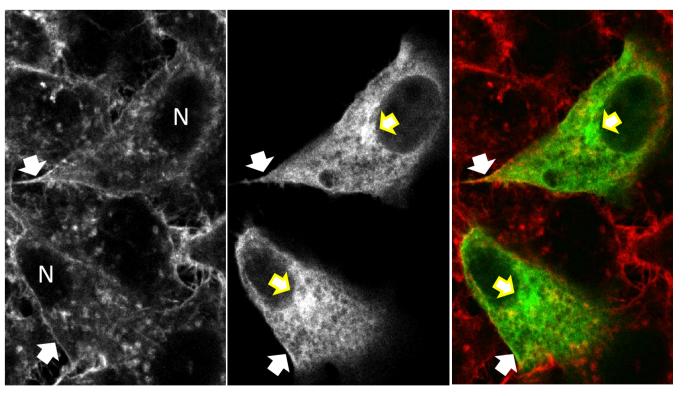




Fig. 8 : Comparison of LdPIBPnex sequence with homologues from other Leishmania spp. indicates a high conservation. L. donovani = Ld, L. infantum = Lin, L. major = Lmj, L.mexicana = Lmx, L. braziliensis = Lbr. Purple framed area PX domain, Red framed area BAR domain



Fig. 9: *L. donovani* promastigotes immunostained with a) anti-*Ld*PIBPnex (rabbit pAb) and anti-L. donovani (mouse pAb) specific Abs and second arabbit Alexa488 and a-mouse Alexa546 Abs respectively. Images are single optical sections of a series acquired by TCS-SP confocal Leica microscope with a 63X lense. LdPIBPnex is localized as spots on the flagellum and in the cell body of the promastigote. Green and Red FL are presented as BW images. Overlay in color.

Fig. 10 : J744 Macrophages were infected with L. donovani promastigotes for 1 hr, fixed (4% PFA) and immuno-stained for LdPIBPnex (a-LdPIBPnex and a-mouse-Alexa 488) and F-actin (phaloidin-Alexa546). Images are single optical sections of a series of images acquired by confocal TCS-SP Leica microscope with a 63X lense. LdPIBPnex epitopes were detected on the macrophage on sites of early phagocytic events (framed areas)

Fig. 11 : HeLa cells transfected with the pEGFP-LdPIBPnex pasmid for 24 hrs, were fixed (PFA 4%) and stained for F-actin with phaloidin-Alexa546. *Ld*PIBPnex-GFP shows a cytoplasmic membrane-like staining and partially colocalizes with F-actin at the cell cortex (white arrows). Yellow arrows indicate Golgi-like localization of LdPIBPnex-GFP. Separate green and red FL are presented as BW images. Overlay in color.

Conclusions-Future work	Literature	
 LdPIBPnex is a nexin-like protein highly conserved amongst Leishmania spp (Fig. 8) LdPIBPnex is expressed as a soluble protein (Fig. 7) at the logarithmic and stationary phases of the promastigote growth in culture (Fig. 6) with a higher expression at the lag phase indicating a possible role at the parasite's S phase of growth. LdPIBPnex secretion was confirmed in <i>L. donovani</i> promastigotes cultured at 25°C (temperature of arthropod host) (Fig. 5). The protein's secretion at 37°C (temperature of mammalian host), is under investigation. LdPIBPnex is localized in vesicle-like structures in <i>L. donovani</i> promastigote cell-body and flagellum and near the flagellar pocket (the main endo/exocytosis area) (Fig. 9 arrows). In mouse J774 macrophages infected with <i>L. donovani</i> promastigotes LdPIBPnex epitopes were mainly localized on macrophage surface membrane at site's of phagocytic events (Fig. 10, frames) 	 Cultured Extracellular Amastigotes. 2. Torrecilhas, A.C. et al, 2012. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. 3. J Maxwell Silverman, et al, 2008. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. 4. Jez Carlton, et al, 2005. Sorting Nexins – Unifying Trends and New Perspectives. 	
 The GST-LdPIBPnex protein (Fig. 4) will be used to analyze binding to Phosphoinositides and in pull down assays to identify LdPIBPnex partners in Leishmania and macrophages. The function of LdPIBPnex will be studied by generating LdPIBPnex KO L. donovani mutants or by overexpressing dominant negative mutants of the protein in L. donovani promastigotes. 	5. Peter J. Cullen 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins	

Funding : This work was partially funded by the Greek GSRT in the action **«ANANTYEIAKEE ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ -ΚΡΗΠΙΣ»**

