

Aplicación de ecualizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de la saliva de *Ornithodoros moubata*

Ricardo Pérez-Sánchez, Ana Oleaga, Mar Siles-Lucas, Verónica Díaz-Martín, Eduardo de la Torre Escudero, Ana Hernández-González, Raúl Manzano-Román

Laboratorio de Parasitología Animal. IRNASA. CSIC. Salamanca

Resumen

El extracto salival (SGE) de la garrapata *Ornithodoros moubata* contiene una proteína antigénica (Om44) de interés para el desarrollo de una vacuna anti-*O. moubata*. Om44 es minoritaria en el SGE, lo que dificulta su detección e identificación. El tratamiento del SGE con un ecualizador de proteínas permite concentrar a Om44 hasta niveles perfectamente detectables en geles 2D teñidos con plata e identificar a las proteínas presentes en el spot correspondiente, aunque para ello haya que recurrir a la secuenciación de novo por estar *O. moubata* muy poco secuenciada.

Ornithodoros moubata es un argásido endófilo africano que se refugia en el interior de las madrigueras de los animales salvajes, de las pocilgas domésticas e incluso de las viviendas humanas.

investigación de vacunas antigarrapata como método alternativo de control.

En trabajos anteriores nuestro equipo inició el desarrollo de una vacuna anti-*O. moubata* inmunizando cerdos con un extracto proteico de glándulas salivales (SGE) de este argásido. El SGE indujo una respuesta inmunitaria capaz de reducir hasta en un 70% las tasas de alimentación y reproducción del argásido. El antígeno inductor de esta respuesta es una proteína de 44 kDa (Om44) que se une a la molécula P-selectina del hospedador, lo que previsiblemente bloquea las respuestas hemostáticas mediadas por la P-selectina y permite a la garrapata completar la ingesta de sangre [1].

Consecuentemente, nuestro siguiente objetivo fue la identificación de Om44, como paso previo para su clonación y obtención en forma recombi-

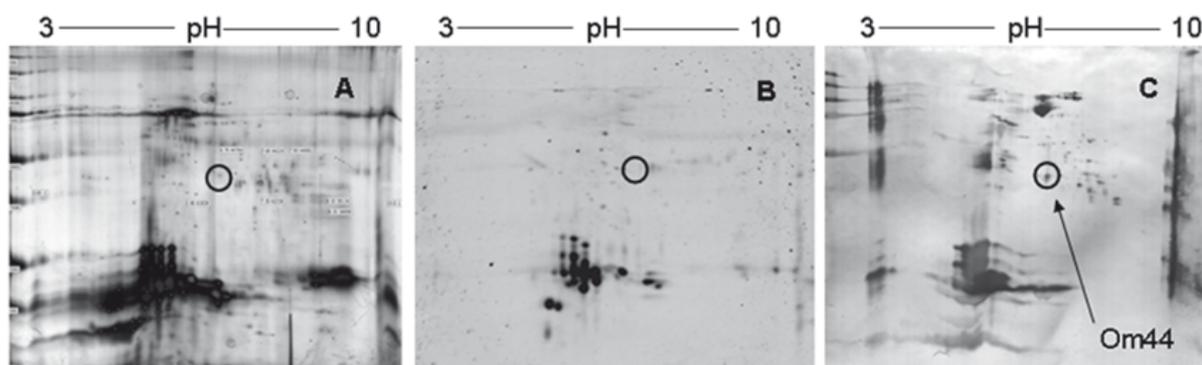


Figura 1. SGE sin ecualizar separado en geles 2D (12% acrilamida, pH 3-10) teñidos con plata (A) y Sypro rubi (B). Western blot con suero de cerdo vacunado con SGE (C).

Sus principales hospedadores son los facoceros, los cerdos y las personas, a los que puede transmitir graves enfermedades como la Peste porcina africana y la Fiebre recurrente humana. La eliminación de esta garrapata del medio sinantrópico puede facilitar el control de las citadas enfermedades. Los inconvenientes del uso de acaricidas en la lucha contra las garrapatas han favorecido la in-

nante. Abordamos dicha identificación mediante una estrategia proteómica clásica: separación del SGE en geles 2D, localización del spot correspondiente a Om44 y análisis del mismo por espectrometría de masas. Esta estrategia se enfrentó con dos problemas. El primero es que Om44 es minoritaria en el SGE y, aunque su spot sí se detecta en western blot 2D usando sueros de cerdos vacunados, no es

visible en geles 2D teñidos con plata o con Sypro Rubi (Figura 1). Para solucionar este problema, el SGE se trató con un equalizador de proteínas [2] utilizando el kit ProteoMiner Protein Enrichment (Bio-Rad). El SGE ecualizado se resolvió en geles 2D y se analizó en western blot 2D, lo que permitió localizar y cortar el spot correspondiente a la Om44 (44 kDa, pI 6,8), claramente visible ahora en geles 2D teñidos con plata (Figura 2).

Solucionado el primer problema, el segundo al que nos enfrentamos fue que *O. moubata* está aun muy poco secuenciado, como ocurre en general con otras garrapatas [3]. Esto dificulta la identificación por comparación de huellas peptídicas y espectros de fragmentación, obligándonos a recurrir a la secuenciación *de novo* de péptidos tripsicos de Om44. El inconveniente de la secuenciación *de novo* es que es caro y sus resultados no siempre garantizan la identificación [4]. La ventaja es que las secuencias peptídicas *de novo* pueden utilizarse como base para el diseño de oligonucleótidos con los cuales abordar la amplificación y clonaje del cDNA codificante de Om44 sin conocer *a priori* la identidad de la pro-

teína. Los resultados de la secuenciación *de novo* de los péptidos procedentes del spot de la Om44 se muestran en la tabla 1. Se han identificado 11 proteínas, lo cual plantea un nuevo problema: ¿cuál de ellas es la proteína Om44?. Teniendo en cuenta parámetros proteómicos, como el score, pI y peso molecular, y biológicos, como su localización citoplasmática, pensamos que enolasa o actina pueden ser Om44. El resto de las proteínas identificadas quizá sean contaminaciones, aunque no podemos descartar que algunas de ellas tengan un homólogo en *O. moubata* con un peso molecular y pI compatibles con los del spot analizado.

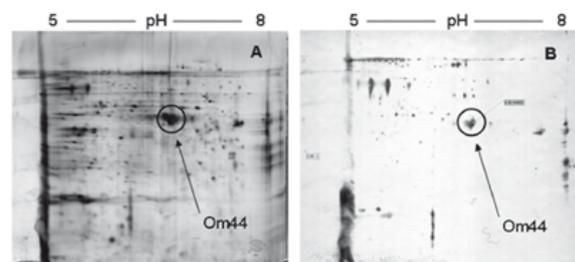


Figura 2. SGE equalizado separado en geles 2D (12% acrilamida, pH 5-8) teñidos con plata (A). Western blot con suero de cerdo vacunado con SGE (B).

Tabla 1. Proteínas identificadas por secuenciación *de novo* a partir del spot correspondiente a Om44.

Numero de acceso	Proteína	Péptido	Score	pI / MW teóricos	Función
P06733	Enolasa. <i>Homo sapiens</i>	²³⁹ VVIGMDVAASEFFR ²⁵²	175,5	6.73 / 47024	Glucólisis, Fibrinolisis
Q3LGW2	Actina. <i>Ornithodoros moubata</i>	²⁰ AGFAGDDAPR ²⁹ ²¹⁷ LCYVALDFEQE-MATAASSSSLEK ²³⁹	94,6	5.29 / 41793	Estructural
P25705	¹ ATP-synthase subunit α , mitochondrial precursor. <i>H. sapiens</i>	⁵²⁰ EIVTNFLAGFEA ⁵³¹	80,8	9.16 / 59750	Síntesis de ATP
P09867	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. <i>Bos taurus</i>	⁵⁶ GFGFVITYATVEEVDAAMNAR ⁷⁵	55,1	9.27 / 34196	Procesamiento y transporte de RNA
B7Q349	Elongation factor-1. <i>Ixodes scapularis</i>	¹¹¹ NMITGTSQADCAVLIVAAGT-GEFEAGISK ¹²⁹	52,6	9.13 / 50753	Biosíntesis de proteínas
P15252	¹ Elongation factor <i>Hevea brasiliensis</i>	⁴³ SGPLQPGVDIIEGPVK ⁵⁸	50,4	5.04 / 14721	Alérgeno
P81605	¹ Dermcidin. <i>Homo sapiens</i>	⁴³ ENAGEDPGLAR ⁵³	50,2	6.09 / 11283	Antimicrobiano.
P0ACT0	¹ HTH-type transcriptional regulator acrR. <i>Escherichia coli</i>	¹⁶² RAAIIMR ¹⁶⁸	42,8	5.66 / 24766	Regulación de la transcripción
P40227	¹ Chaperone containing T-complex protein 1 subunit z. <i>Homo sapiens</i>	⁴³³ AQLGVQAFADALLIPK ⁴⁴⁹	42,0	6.24 / 58024	Chaperona Plegamiento de proteínas
P24789	Vimentin-1/2 <i>Xenopus laevis</i>	⁹⁹ AEMIELNDR ¹⁰⁷	40,9	5.16 / 52844	Estructural. Filamentos citoesqueleto
Q98QV2	¹ Translation initiation factor IF-3. <i>Mycoplasma pulmonis</i>	¹⁴¹ ELGIDTLNR ¹⁴⁹	40,3	9.65 / 23283	Biosíntesis de proteínas

¹ Posibles contaminantes

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Junta de Castilla y León (CSI07A08).

Referencias

- [1] García-Varas S, Manzano-Román R, Fernández-Soto F, Encinas-Grandes A, Oleaga A y Pérez-Sánchez R. Purification and characterization of a P-selectin binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int J Parasitol* 2009, doi:10.1016/j.ijpara.2009.08.011
- [2] Righetti PG, Bochetti E, Lomas L y Citterio A. Protein Equalizer Technology: The quest for a democratic proteome. *Proteomics* 2006;6:3980-92
- [3] Francischetti IMB, Sá-Nunes A, Mans BJ, Santos, IM y Ribeiro JMC. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 2009;14:2051-88
- [4] Oleaga A, Escudero-Población A, Camafeita E y Pérez-Sánchez R. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2007;37:1149-59.

Identificación proteómica y análisis bioinformático de proteínas secretadas por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* pertenecientes a la familia MASP (*Mucin associated Surface Proteins*)

Luis Miguel De Pablos, Gloria González, Víctor Seco Hidalgo, Isabel María Díaz Lozano, Antonio Osuna

Instituto Biotecnología. Universidad de Granada. Grupo de Parasitología Bioquímica y Molecular

Resumen

El agente causal de la tripanosomiasis o enfermedad de Chagas es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. Dicho parásito es un organismo intracelular obligado que utiliza una enorme cantidad de tipos celulares para multiplicarse. Durante el proceso de entrada e invasión celular, *T. cruzi* secreta una serie de proteínas encargadas del reconocimiento de la célula hospedadora y la posterior entrada del protozoo en ella.

En el presente trabajo se describe la identificación de dos proteínas pertenecientes a la familia MASP (*Mucin Associated Surface Protein*) secretadas tras dos horas de interacción célula-parásito. Las secuencias de estas proteínas poseen las características básicas de la familia MASP con dos regiones hidrofóbicas en los extremos N- y C- terminal y una región central en la cual existen sitios para la N-glicosilación. Tras mapear epítomos de tipo MHC-I en las secuencias encontramos varias regiones en las proteínas que podrían compor-

tarse potencialmente como posibles lugares que estimularan la generación de una respuesta inmune celular frente a *T. cruzi*. Como conclusión, consideramos que las proteínas MASP identificadas pueden ser potenciales antígenos inmunógenos y posibles herramientas diagnósticas para evaluar una respuesta humoral frente a éstas durante el transcurso de la enfermedad.

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado, perteneciente al Orden Kinetoplastida y agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, estimándose en unos 16-18 millones las personas infectadas principalmente en Centro y Sudamérica [1, 2]. La familia MASP (*Mucin Associated Surface Protein*) descrita por primera vez tras el desarrollo y posterior publicación de los datos del genoma de *T. cruzi*, constituye una extensa familia génica que representa el 6% del genoma del parásito aproximadamente [3]. Las MASPs, pueden mostrar modificaciones post traduccionales similares a las de las mucinas, describiéndose como proteínas N-glicosiladas [4]. Las aproximaciones proteómi-