

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-

cas realizadas, muestran como la expresión de las MASPs es pequeña en comparación con el número de genes encontrados. Si bien no se conocen los mecanismos que han permitido la expansión de la familia de las MASPs en *T. cruzi*, la presión inmune pudiera constituir la fuerza inductora que ha provocado la amplia presencia de genes *masp* en el genoma del trypanosomatidos.

Se estudió el medio de interacción célula-parásito, incubándose durante dos horas la fase trypomastigota metacíclica de *T. cruzi* con células Vero en monocapa. Una vez purificado el medio, se seleccionaron diferentes bandas en geles de SDS-PAGE unidimensionales para su posterior identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF y MALDI-TOF-TOF) y análisis mediante trampa iónica de los péptidos fragmentados.

Una vez identificadas las secuencias mediante los motores de búsqueda Mascot y proteome discover, estas se analizaron en busca de motivos estructurales mediante el paquete de software bioinformático de ExpASY (<http://www.expasy.ch/tools/>). Además se realizó un mapeo de epítomos para éstas, utilizando los programas BIMAS y SYFPEITHI.

Tras el análisis proteómico, identificamos dos nuevas proteínas pertenecientes a la familia MASP de *T. cruzi*. Estas proteínas poseen pesos moleculares de 52 kDa y 5 kDa, siendo secretadas durante el proceso de invasión celular por parte del parásito. Tras la búsqueda de motivos estructurales encontramos que existían dos regiones N- y C- terminal altamente hidrofóbicas, un lugar para N-Glicosilación y en el caso de la proteína de 52 kDa un lugar de unión a ATP/GTP (P-loop).

Estas proteínas poseen potenciales epítomos de clase MHC-I principalmente en los extremos de las secuencias coincidiendo con las regiones más hidrofóbicas de éstas. Los epítomos se sitúan en las

posiciones conservadas para esta familia, generándose un panel de péptidos potencialmente positivos para ser expuestos por moléculas MHC-I.

La obtención en el medio de interacción célula-parásito de dos miembros pertenecientes a la familia MASP indica que proteínas pertenecientes a esta familia son capaces de secretarse y de poseer una posible implicación en la entrada del parásito en la célula hospedadora. Además los epítomo encontrados demuestra como estas secuencias están potencialmente implicadas en la generación de una respuesta inmune celular frente al parásito. Por tanto, la familia MASP será en un futuro objeto de nuestros estudios tanto como posible diana terapéutica como herramientas diagnósticas debido a su clara exposición al sistema inmunitario durante una infección por *T. cruzi*.

Referencias

- [1] World Health Organization. Control of Chagas disease 2002; 905: 1-109.
- [2] Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U. y Gürtler RE. The Challenges of Chagas Disease-Grim Outlook or Glimmer of Hope? PLoS Med 2007; 4: 1852-1857.
- [3] El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E E, Worthey A, Delcher AL y Blandin G. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 2005; 309: 409-415.
- [4] Bartholomeu, DC, Cerqueira GC, Lea AA, daRocha WD, Pais FB, Macedo C, Djikeng A, Texeira SMR y El-Sayed NM. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (*masp*) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res 2009; 1-11.