

Tesis de Licenciatura

Purificación y caracterización bioquímica de una serín carboxipeptidasa de *Trypanosoma* *cruzi*

García, Mayra

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

García, Mayra. (). Purificación y caracterización bioquímica de una serín carboxipeptidasa de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBI0000654_Garcia

Cita tipo Chicago:

García, Mayra. "Purificación y caracterización bioquímica de una serín carboxipeptidasa de *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBI0000654_Garcia

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Purificación y caracterización bioquímica de una
serín carboxipeptidasa de *Trypanosoma cruzi***

Seminario de Licenciatura

Mayra García

Director: Dr. Juan José Cazzulo

**Instituto de Investigaciones Bioquímicas “Luis Federico Leloir”,
Fundación Campomar – CONICET – FCEyN - UBA**

1999

Dedicado a quien puso la prueba más dolorosa y difícil

a mis sueños, convicciones y principios, *Eduardo*.

Y a todos aquellos que me ayudaron a superarla,

especialmente *Ximena* y *Juan*.

Agradecimientos

Al Dr. Juan José Cazzulo, por darme un lugar en su laboratorio.

A Berta y Liliana por cultivarme los parásitos.

A Fabiola por su colaboración y comprensión.

A Fernán por su tranquilidad, ayuda y consejo certero.

A Carlitos Buscaglia, Javier Di Noia y Carlitos Labriola por aconsejarme en mis dudas y simplificarme el trabajo con sus sugerencias.

A todos mis compañeros del instituto (Paula, Fabiola, Tamara, Julieta, Ileana, Juan, Iván, Ramiro, etc.) y a Lara por los buenos momentos compartidos.

A mis padres, por el esfuerzo empeñado para darme la posibilidad de ser lo que quisiese.

A mi abuela, que me acompañó en espíritu durante toda mi carrera.

A mi tía, por sus frases justas y personalizadas, largamente meditadas.

A Ximena, mi querida hermana, fuente de genuino cariño, inagotable energía e infinita sabiduría.

A Alejandra, Mariano, María y Alfredo por estar.

A Juan Sebastián, por su especial paciencia y contención, y sus preciadas ideas y colaboración.

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| A | absorbancia |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| APEE | N-Acetyl-L-Fenilalanil Etil Éster |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ATEE | N-Acetyl-L-Tirosina Etil Éster |
| BCIP | 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil-fosfato |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| CAPS | amortiguador 3-[ciclohexilamino]-1-ácido propanosulfónico |
| °C | grados centígrados |
| cm | centímetros |
| DTT | ditiotreitol |
| EDTA | ácido etilén diamino tetracético |
| E-64 | trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4guanidino)-butano |
| FA-Ala-Lys | N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Ala-Lys |
| FA-Phe-Phe | N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Phe-Phe |
| FPLC™ | Fast Protein Liquid Chromatography |
| g | gramo |
| HPLC™ | High Performance Liquid Chromatography |
| kDa | kiloDaltons |
| keV | kiloelectronvolts |
| m/z | relación masa-carga |
| MES | ácido 2 - N - morfolino etanosulfónico |
| μg | microgramos |
| μl | microlitros |
| μM | micromolar |
| mg | miligramos |
| ml | mililitros |
| ml/min | mililitros por minuto |
| mm | milímetros |

Abreviaturas

| | |
|--|---|
| mM | milimolar |
| mU | mieluñidades |
| min | minuto |
| M | molar |
| M⁻¹. cm⁻¹ | 1/(molar centímetro) |
| NADP | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada) |
| NBT | azul de tetrazolio |
| nm | nanometros |
| NP - 40 | nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol) |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PAS | tinción de Schiff con ácido periódico-fucsina básica |
| pb | pares de bases |
| p-CMB | ácido p-cloromercuribenzoico |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PMSF | fenil metil sulfonil fluoruro |
| PVDF | difluoruro de polivinilideno |
| rpm | revoluciones por minuto |
| SDS | dodecilsulfato de sodio |
| TBS | amortiguador Tris salino |
| TLCK | N- α -p-tosil-L-lisil clorometilcetona |
| TPCK | N- α -p-tosil-L-fenilalanil clorometilcetona |
| Tris | tris-(hidroximetil)aminometano |
| U/ml | unidades por mililitro |
| V | volts |
| v/v | relaciones de volumen |

Índice

| | |
|---------------------|----------|
| Introducción | I |
|---------------------|----------|

| | |
|--|---------------|
| 1. La enfermedad de Chagas | 1 |
| 1.1 Descripción general | 1 |
| 1.2 Etapas de la enfermedad | 1 |
| 1.3 Diagnóstico | 3 |
| 1.4 Tratamiento | 4 |
| 2. Trypanosomas | 4 |
| 2.1 Taxonomía | 5 |
| 2.2 Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i> | 6 |
| 2.2.1 En el huésped invertebrado | 7 |
| 2.2.2 En el huésped vertebrado | 7 |
| 2.3 Rasgos excluyentes de los trypanosomas | 8 |
| 3. Proteasas | 10 |
| 3.1 Generalidades | 10 |
| 3.2.1 Proteasas en Protozoarios parásitos | 14 |
| 3.2.2 Proteasas en <i>Trypanosoma cruzi</i> | 14 |
| 3.3 Carboxipeptidasas | 16 |

| | |
|------------------|-----------|
| Objetivos | II |
|------------------|-----------|

| | |
|------------------|-----------|
| Objetivos | 19 |
|------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|------------|
| Materiales y Métodos | III |
|-----------------------------|------------|

| | |
|---|-----------|
| 1. Purificación de la carboxipeptidasa | 20 |
| 1.1 Preparación del extracto libre de células | 20 |
| 1.2 Cromatografía de afinidad con Con-A Sefarosa | 21 |
| 1.3 Cromatografía de intercambio aniónico en Mono Q | 21 |
| 1.4 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) | 22 |
| 1.5 Filtración molecular en Superdex 75 | 22 |

| | |
|---|----|
| 2. Evaluación de la purificación | 22 |
| 2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) | 22 |
| 2.2 Medición de actividades | 23 |
| 2.2.1 Actividad de carboxipeptidasa | 23 |
| 2.2.2 Actividad de cruzipaína | 24 |
| 2.3 Medición de proteínas | 24 |
| | |
| 3. Caracterización parcial de la enzima | 25 |
| 3.1 Peso molecular aparente de subunidad por SDS-PAGE | 25 |
| 3.2 Presencia de puentes disulfuro | 25 |
| 3.3 Glicosilación | 25 |
| | |
| 4. Determinación de la actividad enzimática | 26 |
| 4.1 Especificidad de sustrato | 26 |
| 4.2 Caracterización de la actividad en función del pH | 28 |
| 4.3 Patrón de inhibición | 28 |
| | |
| 5. Estudios cinéticos | 29 |
| | |
| 6. Localización subcelular | 29 |
| | |
| 7. Secuenciación | 30 |
| 7.1 Secuenciación del extremo N-terminal | 30 |
| 7.2 Secuenciación de péptidos internos | 31 |
| | |
| 8. Obtención de anticuerpos específicos | 32 |
| | |
| 9. Western blots | 33 |
| | |
| 10. Dot blots | 34 |
| | |
| Reactivos | 34 |

Índice

| | |
|-------------------|-----------|
| Resultados | IV |
|-------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| 1. Purificación de la carboxipeptidasa | 35 |
| 2. Caracterización parcial de la enzima | 41 |
| 2.1 Peso molecular aparente de subunidad por SDS-PAGE | 41 |
| 2.2 Presencia de puentes disulfuro | 42 |
| 2.3 Glicosilación | 43 |
| 3. Determinación de la actividad enzimática | 44 |
| 3.1 Especificidad de sustrato | 44 |
| 3.2 Caracterización de la actividad en función del pH | 46 |
| 3.3 Patrón de inhibición | 47 |
| 4. Estudios cinéticos | 48 |
| 5. Localización subcelular | 49 |
| 6. Secuenciación | 50 |
| 7. Western blots | 54 |

| | |
|------------------|----------|
| Discusión | V |
|------------------|----------|

| | |
|------------------|-----------|
| Discusión | 58 |
|------------------|-----------|

| | |
|---------------------|-----------|
| Conclusiones | VI |
|---------------------|-----------|

| | |
|---------------------|-----------|
| Conclusiones | 63 |
|---------------------|-----------|

| | |
|---------------------|------------|
| Bibliografía | VII |
|---------------------|------------|

| | |
|---------------------|-----------|
| Bibliografía | 64 |
|---------------------|-----------|

Introducción

1. La enfermedad de Chagas

1.1Descripción general

El protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* es el parásito causal de la enfermedad de Chagas. El agente etiológico fue descripto por primera vez en 1909 por Carlos Chagas. Considerada una de las parasitosis más importantes en América Latina, se extiende desde el paralelo 42 norte hasta el 46 sur. Se estima que 90 millones de personas están bajo riesgo de infección (1). Los vectores de la enfermedad pertenecen a la familia Reduviidae, y en Argentina, la especie de importancia epidemiológica es *Triatoma infestans* (2), conocida como vinchuca. La distribución de la parasitosis se superpone con la distribución geográfica del vector debido a que está asociada a factores socio-económicos de pobreza que favorecen su instalación en la vivienda humana.

El hombre habitualmente se infecta con *T. cruzi* a través de los tripomastigotes infectivos contenidos en las deyecciones del vector. A pesar que la transmisión vectorial es la más importante, cabe destacar que las transfusiones de sangre, la transmisión transplacentaria y el trasplante de órganos son también mecanismos de transmisión (3, 4).

1.2Etapas de la enfermedad

La enfermedad se manifiesta en sólo un 5% de los individuos infectados y generalmente las manifestaciones clínicas más severas ocurren en niños menores de 2 años.

Los síntomas más comunes suelen ser fiebres, cefaleas, irritabilidad, un cuadro general muy parecido a un estado gripal. Al penetrar en el huésped, el parásito produce una inflamación local llamada “chagoma”. Si el parásito entra a través de la conjuntiva o la piel periorbitaria, se desarrolla el complejo oftalmoganglionar o Signo de Romaña. Este signo

típico de la enfermedad, se detecta en aproximadamente el 90% de los casos de infección reciente (1).

La mayoría de los casos fatales presentan daños cardíacos severos y/o meningoencefalitis chagásica principalmente durante el primer mes de la enfermedad.

La etapa aguda, que dura entre 40 y 60 días, se caracteriza por una parasitemia elevada que disminuye hasta niveles prácticamente indetectables al entrar en la etapa crónica. Durante esta segunda fase, la enfermedad puede permanecer durante décadas sin manifestarse clínicamente. El 20% de los pacientes crónicos pueden desarrollar formas típicas de la enfermedad de Chagas, caracterizadas por las megavísceras, cardiopatías, afecciones neurológicas, hipertrofia y dilatación del tubo digestivo (5, 6). En nuestro país la sintomatología más frecuente es la miocardiopatía chagásica (7).

Existe otra etapa ubicada entre las anteriores denominada fase indeterminada. Ésta comienza entre 8 y 10 semanas después de transcurrido el período agudo. Su nombre se debe a que carece de manifestaciones clínicas, aunque los pacientes mantienen su serología positiva. Cabe destacar que sólo entre un 20 y un 60% de los casos son parasitológicamente positivos, cuando se los estudia por xenodiagnóstico, ya que los parásitos circulantes son de difícil detección. Aproximadamente el 70% de los infectados permanecen en la misma condición de enfermedad no progresiva durante el resto de su vida.

La transmisión transplacentaria, por transfusiones o transplantes puede ocurrir tanto en las etapas aguda, indeterminada o crónica de la infección. Aproximadamente entre 0.5 y 3.5% de los hijos de madres chagásicas nacen infectados.

El *Trypanosoma cruzi* induce en el huésped mamífero una fuerte respuesta inmune humoral y celular. Ambas intervienen en el equilibrio huésped-parásito. La respuesta humoral específica se utiliza para el diagnóstico, ya que se mantiene toda la vida.

La participación de las reacciones de autoinmunidad en la enfermedad de Chagas es un tema en discusión en el que últimamente ha habido aportes. Desde hace mucho tiempo se sospecha de un componente autoinmune en la enfermedad de Chagas, idea avalada por distintos experimentos en los que se demostraban una reacción cruzada entre antígenos del parásito y del hospedador vertebrado.

Algunos de estos antígenos del hospedador pertenecen al tejido cardíaco que es uno de los órganos afectados por la presencia del parásito. También se habían encontrado antígenos de reacción cruzada en el sistema nervioso periférico, y la respuesta inmune resultaba en una patología que llevaba a la desmielinización y finalmente degeneración axónica (8).

Sin embargo, esta hipótesis ha sido puesta recientemente en duda por un trabajo del grupo de Tarleton (9) en el cual, con experimentos de trasplantes cardíacos, se demostró que en ausencia de parásitos no hay enfermedad. Existen a su vez otros trabajos sobre inhibidores de la síntesis de esteroles, que actuarían sobre el citocromo P-450, que apoyarían esta última hipótesis (10).

1.3 Diagnóstico

Para realizar un diagnóstico certero de la enfermedad de Chagas, se debe discriminar la etapa de la enfermedad en que se encuentra el paciente.

Debido a que en la etapa aguda de la infección la parasitemia es elevada, el método de elección es la búsqueda de tripomastigotes en sangre periférica. En la etapa crónica, en cambio, los parásitos circulantes son de difícil detección, por lo que la sensibilidad del xenodiagnóstico y demás métodos similares es reducida. Los métodos utilizados de rutina son los serológicos, entre los cuales los más comúnmente empleados son IFI (inmunofluorescencia indirecta), ELISA, IHA, DA (hemoaglutinación indirecta y directa) y fijación del complemento (1).

1.4 Tratamiento

El tratamiento antiparasitario en humanos ha resultado eficaz en los casos agudos, aunque se ha comunicado que en niños con infección congénita, el mismo puede ser efectivo por lo menos durante los primeros 16 meses de adquirida la infección (11). El tratamiento no es efectivo en casos crónicos.

Existen actualmente dos compuestos nitroheterocílicos utilizados: el nifurtimox (Lampit, Bayer), y el benznidazol (Ranamil, Roche). Ambos pueden producir severos síntomas de intolerancia y el porcentaje de pacientes curados varía con la cepa de parásito infectiva.

Estas dificultades obligan al desarrollo de nuevas drogas o de una vacuna; pero hasta el momento los distintos intentos no han resultado efectivos, obteniéndose, en el mejor de los casos, curación parcial.

2. Trypanosomas

Los trypanosomas son protozoos parásitos que causan serias enfermedades en el hombre y en animales domésticos en África y América Latina. Son flagelados digeneicos que presentan durante el ciclo de vida alternancia entre un huésped invertebrado y uno vertebrado (12, 13).

Las investigaciones se han centrado en dos especies de trypanosomas, debido a su importancia sanitaria: *Trypanosoma brucei* que produce la trypanosomiasis africana o enfermedad del sueño, transmitida por la mosca *tse-tse*, y *Trypanosoma cruzi* que es el agente causal de la enfermedad de Chagas.

2.1 Taxonomía

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares. En la clasificación moderna son considerados un subreino del reino Protista. Los trypanosomas, y más precisamente *Trypanosoma cruzi*, son protozoos cuya ubicación taxonómica, según una revisión del Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología es la siguiente:

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora: un solo tipo de núcleo; flagelo, pseudo-podio o ambos tipos de organelas.

Subphylum Mastigophora: uno o más flagelos; reproducción asexual por fisión binaria; reproducción sexual en algunos grupos.

Clase Zoomastigophora: cloroplastos ausentes; uno o más flagelos.

Orden Kinetoplastida: uno o dos flagelos que emergen de una depresión; una sola mitocondria que se extiende por toda la célula como un único tubo o una red de tubos; generalmente una organela autorreplicante, el kinetoplasto; aparato de Golgi típicamente en la región de la depresión flagelar; parásitos y de vida libre.

Suborden Trypanosomatina: un solo flagelo libre ó con membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto; parásitos.

Familia Trypanosomatidae: incluye varios géneros monogeneicos (parásitos de invertebrados): *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* y géneros digeneicos (parásitos que alternan con huésped vertebrado e invertebrado): *Leishmania*, *Trypanosoma*.

Género Trypanosoma

Subgénero Schyzotrypanum

Especie cruzi

Los miembros del género *Trypanosoma* han sido divididos en dos grandes grupos:

- El grupo Salivaria incluye los trypanosomas que completan su desarrollo en las glándulas salivales del vector.
Ej: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*.
- El grupo Estercoraria comprende los trypanosomas que completan su desarrollo en el tubo digestivo del vector.
Ej: *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma lewisi*.

2.2 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

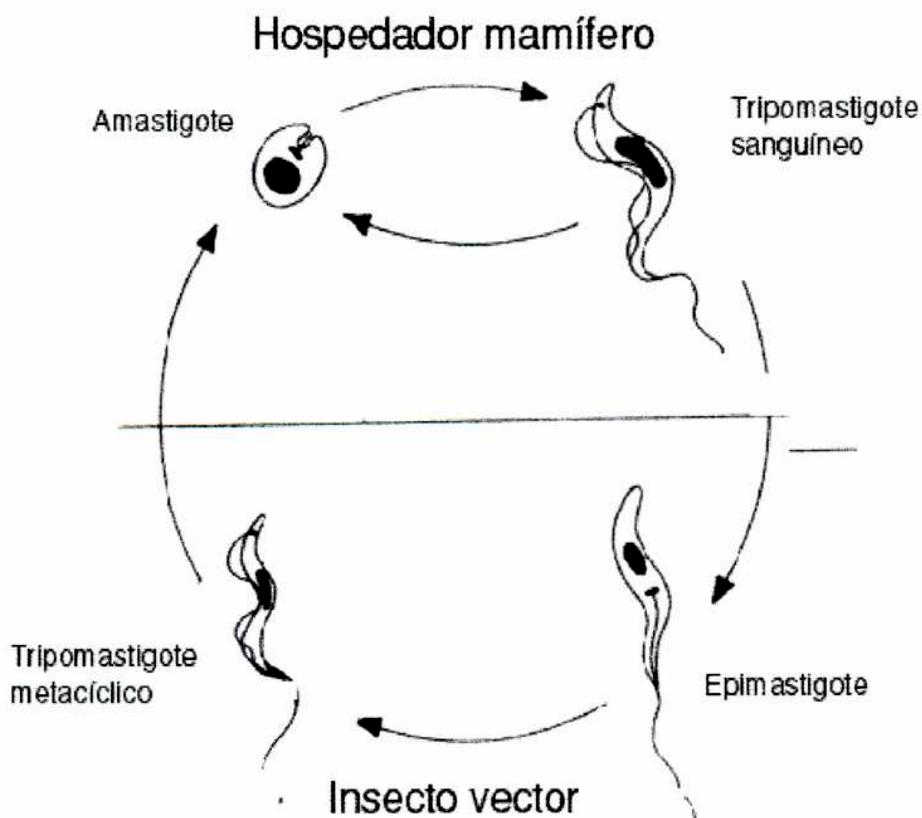


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

2.2.1 En el huésped invertebrado

El vector (normalmente la vinchuca) es un insecto hematófago que se infecta por ingestión de trypanosomas presentes en sangre periférica del huésped vertebrado. Las formas sanguíneas ingeridas (trypomastigotes) se diferencian en el intestino medio, dando epimastigotes, los cuales se dividen activamente en el intestino y mantienen un estado permanente de infección en el insecto. En el recto, algunos epimastigotes se diferencian en trypomastigotes metacíclicos infectantes que se eliminan con las heces durante o después de la ingesta de sangre del insecto.

No han sido detectados estadios intracelulares del parásito en el vector.

2.2.2 En el huésped vertebrado

Los tripomastigotes metacíclicos eliminados con las heces del insecto penetran en el huésped vertebrado a través de microescoriaciones de la piel o de mucosas como la conjuntiva. Invaden luego las células por un proceso de endocitosis iniciando así el ciclo intracelular. La primera célula a infectar es el macrófago. La forma tripomastigote, a diferencia de la epimastigote, es entonces capaz de invadir células del huésped y resistir al ataque de los lisosomas mediante el escape, por varios medios, de la vacuola fagocítica. El pasaje por las vesículas lisosomales sería necesario para la posterior diferenciación del parásito ya que la incubación de tripomastigotes en un medio de pH 5,2 produce la diferenciación al estadio de amastigotes (14), que son formas redondeadas que poseen un flagelo muy pequeño y que se multiplican por fisión binaria dentro del citoplasma de la célula. La transformación de amastigotes en trypomastigotes sanguíneos comienza cuando la célula termina de llenarse de amastigotes y se desconoce cuáles serían las señales involucradas en esta diferenciación. Las células parecen soportar la parasitemia sin daño aparente. Luego de la ruptura, la célula muere y se liberan los parásitos (trypomastigotes) en el torrente sanguíneo, por el cual circulan hasta que penetra en nuevas células y comienzan nuevamente el ciclo.

- 3) **Fermentación aeróbica:** El *Trypanosoma cruzi* es capaz de degradar la glucosa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, pero el catabolismo aeróbico no lleva exclusivamente a la producción de CO₂, sino que también existe una verdadera "**fermentación aeróbica**", con liberación al medio de cantidades importantes de succinato y L-alanina, con algo de acetato (13, 16, 17).

El consumo de glucosa y la producción de catabolitos reducidos, es similar en aerobiosis y en anaerobiosis. Las tres formas del parásito (epimastigote, triponastigote y amastigote) producen succinato al metabolizar la glucosa.

- 4) **Edición del ARN:** El término "**edición del ARN**" describe el procesamiento de transcriptos primarios de ARN que lleva a la obtención de moléculas de ARN mensajero listas para ser traducidas y obtener proteínas funcionales (18). El proceso de edición implica la inserción y la delección en menor grado de uridinas en el transcripto primario. Los cambios en la secuencia del ARN crean codones de iniciación (AUG), codones de terminación, y marcos de lectura abiertos. Este fenómeno ocurre en los transcriptos mitocondriales de protozoos parásitos del orden Kinetoplástida pero también se ha observado en otros tipos celulares.

El mecanismo de edición del ARN representa un nuevo método de procesamiento del ARN y también una forma de regulación génica.

- 5) **Complejidad de la membrana plasmática:** La primera y más importante área de contacto entre el huésped y el parásito es la superficie de la célula del trypanosoma. Por eso, es esencial conocer la estructura y función de sus componentes. El objeto principal de la investigación es identificar y aislar polipéptidos que sean importantes en la estimulación de una respuesta inmune protectora (19).

Asimismo, otros aspectos de la interacción huésped-parásito están recibiendo atención:

- a) Los determinantes que llevan al contacto y la penetración.
- b) Las bases de las interacciones entre moléculas del huésped (nutrientes y factores de

crecimiento) y moléculas del parásito (receptores).

- c) Los mecanismos de resistencia del parásito en sus distintos estadios, a los factores líticos y tóxicos que proporciona el ambiente del huésped.

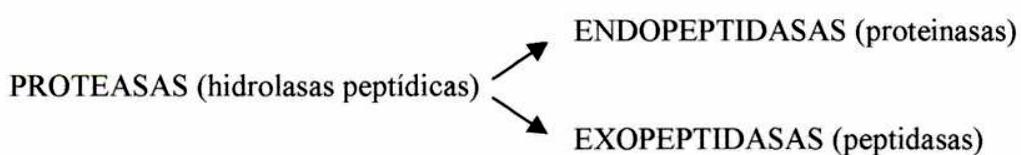
En particular, estos conceptos son pertinentes al *Trypanosoma cruzi* el cual está expuesto al plasma y luego a intermediarios de oxígeno tóxicos generados durante la fagocitosis. El estado epimastigote de *Trypanosoma cruzi* es eficientemente destruido por suero humano por la activación de la vía alterna del complemento. En cambio, el triponastigote metacíclico infectivo, el amastigote intracelular y las formas sanguíneas triponastigote no son lisadas al incubarse con suero humano. A pesar del gran número de estudios que se están realizando, no se tiene una idea clara de la superficie de *Trypanosoma cruzi* debido a la complejidad de su composición antigenica, si bien el avance en este tema es continuo.

Existen evidencias de un anclaje del tipo fosfatidil inositol de algunos antígenos de superficie (Trans-sialidasa), de manera similar al ya visto en las glicoproteínas antigenicas variables de superficie de los trypanosomas africanos (20).

3. Proteasas

3.1 Generalidades

El término proteasa fue establecido en 1928 para definir a las enzimas que degradan proteínas mediante la hidrólisis de sus enlaces peptídicos. La terminología aceptada actualmente es (21):



Por lo tanto, el término proteinasa se aplica sólo a las proteasas de tipo endopeptidasas, que tienen sitios activos específicos que no aceptan sustratos con extremo amino y carboxilo cargados. Las exopeptidasas requieren estos grupos y son capaces de remover uno, dos o tres residuos aminoacídicos del extremo N y uno o dos del C-terminal.

El sitio activo de las exo y endopeptidasas tiene un rol dual: fijar el sustrato y catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico específico.

Se presume que las proteasas aparecieron en las primeras fases de la evolución, ya que organismos primitivos debieron necesitarlas para la digestión y para el metabolismo de sus proteínas (22). En el curso de la evolución adquirieron funciones más complejas, como ser la regulación fisiológica y al mismo tiempo más específicas, restringiendo su acción a determinadas uniones peptídicas en sustratos específicos.

Muchos procesos fisiológicos están regulados por este tipo de proteólisis, por ejemplo: la coagulación y la fibrinólisis, la liberación de hormonas peptídicas de moléculas precursoras, el transporte de proteínas a través de las membranas.

Existen dos mecanismos por los cuales se regula la actividad de las proteasas:

- 1) La activación de precursores inactivos de proteasas (zimógenos) mediante una proteólisis limitada.
- 2) La inactivación de proteasas por la formación de complejos con inhibidores proteicos, peptídicos o su propio pro dominio, en cis y en trans.

En 1960, Hartley propuso una clasificación de las proteasas (exo y endopeptidasas) no basada en su especificidad ni en su origen, sino en el mecanismo catalítico de la reacción. Las “clases” catalíticas de Hartley han sido precisadas como serín, cisteín, aspartil y metalo proteinasas (21, 23).

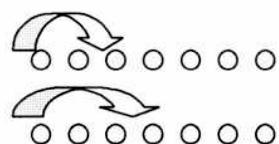
Sin embargo, las exopeptidasas se clasifican actualmente por su especificidad (24), más que por su mecanismo catalítico en:

EXOPEPTIDASAS

- ❖ Aminopeptidasas



- ❖ Dipeptidil-peptidasas, tripeptidil-peptidasas



- ❖ Carboxipeptidasas



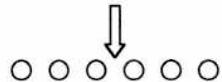
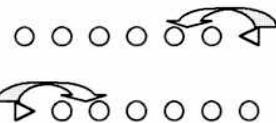
- ❖ Peptidil-dipeptidasas



- ❖ Dipeptidasas



- ❖ Omega peptidasas



ENDOPEPTIDASAS

○ → aminoácido

▷ → bloqueo terminal

Figura 2. Clasificación de las proteasas por su especificidad.

Si se quisiera subdividir las exo y endopeptidasas por su mecanismo catalítico, su clasificación sería:

CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS SEGÚN SU MECANISMO CATALÍTICO^a

- **SERINA** Tríada catalítica Ser, His, Asp. Intermediario covalente con el OH de la Ser. Inhibidas por DIFP, PMSF, TLCK, TPCK, leupeptina, quimostatina. Ejs.: Quimotripsina, Subtilisina, etc.
- **CISTEÍNA** Tríada catalítica Cys, His, Asn. Intermediario covalente con el SH de la Cys. Inhibidas por E-64, organomercuriales, TLCK, TPCK, leupeptina, antipain, iodoacetamida. Ejs.: Papaina (catepsinas B, H, L y S, proteinasas de parásitos), Calpainas, etc.
- **ASPARTIL** Dos residuos de Asp, que en mamíferos provienen uno de cada uno de dos dominios homólogos. pH óptimo muy ácido. Inhibidas por pepstatina. Ejs.: Pepsina (renina, catepsinas D y E), endopeptidasa de HIVy otros retrovirus, leucemia, etc.
- **METALO** Átomo de Zn ligado por dos His y un Glu. HEXXH es el motivo que liga Zn. Resto de la molécula poco conservado. Inhibidas por quelantes de metales (o-fenantrolina, EDTA). Ejs.: Termolisina, Colagenasa, incluyendo gelatinasas, etc.
- **TREONIN** Residuo de Thr N-terminal; intervienen en la catálisis el -OH y el grupo -NH₂ terminal. Inhibidas específicamente por lactacistina. Presentes en la inmensa mayoría de los seres vivos, desde Archaea y Eubacteria hasta mamíferos. Ej.: Proteasoma.
- **PROTEASAS DE MECANISMO CATALÍTICO DESCONOCIDO**

^a Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, "Enzyme Nomenclature 1992", Academic Press, Orlando, Florida, USA, 1992.

Se conocen carboxipeptidasas pertenecientes a las clases serín, cisteín y metaloproteinasas.

3.2.1 Proteasas en Protozoarios parásitos

Algunas funciones potenciales de las proteasas en los parásitos incluirían (23):

1. Invasión del hospedador facilitada por degradación catalizada de los tejidos conectivos.
2. Metabolismo dentro del hospedador tomando ventaja de proteínas abundantes del mismo en el ambiente donde reside el parásito (por ej.: la degradación masiva de la hemoglobina por *Plasmodium* spp.).
3. Evasión inmune o modulación por degradación o activación de moléculas inmunológicas del hospedador.
4. Interacción con los sistemas de coagulación y fibrinólisis de la sangre que por sí mismos están compuestos de cascadas de reacción catalizadas.
5. Remodelación de los parásitos durante la transición de un estadio morfológico a otro.
6. Activación o recambio de hormonas peptídicas, enzimas o proteínas regulatorias.
7. Degradación de proteínas del citoesqueleto del hospedador durante la invasión o ruptura de las células del parásito.

Se debe tener cuidado de no suponer que los sustratos utilizados *in vitro* por las proteasas de los parásitos son necesariamente los sustratos naturales.

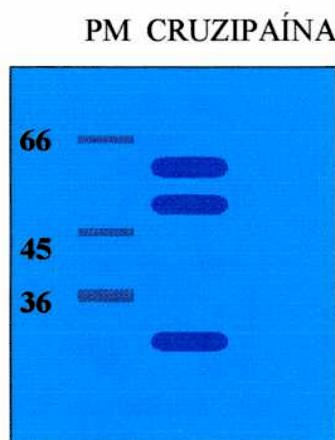
3.2.2 Proteasas en *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi presenta distintas actividades proteolíticas. En general, las descriptas corresponden a proteinasas de tipo cisteína, serina, y metalo (25). También se han descripto de tipo treonina y mecanismo catalítico desconocido Hasta el momento no se informó la

presencia de aspartil proteinasas. Con respecto a las exopeptidasas, hay pocas descripciones, muy superficiales, en preparaciones crudas.

Entre las proteinasas de tipo cisteínicas, se encuentra la cruzipaína, la cisteín proteinasa mayoritaria del parásito en el estadio epimastigote. Esta enzima presenta un patrón de triple banda al correr reducida y hervida en geles de poliacrilamida (26). La explicación a este patrón respondía a la presencia de una banda pequeña (alrededor de 25 kDa) correspondiente al dominio C-terminal de la enzima producto de autoproteólisis, una banda media perteneciente a la enzima madura en su dominio catalítico, y una banda superior (ambas entre los marcadores de 45 y 66 kDa) que podría corresponder a un polimorfismo de los numerosos que presenta la enzima al estar codificada por 130 genes en tandem (27) o por la presencia de diferentes glicosilaciones.

Representación de corrida de la cruzipaína:



Sin embargo, por otros trabajos realizados en el laboratorio por el Lic. Carlos Labriola donde, luego de un tratamiento con anti-calreticulina a complejos anti-cruzipaína-cruzipaína-calreticulina (28), se observa una banda cercana a 66 kDa en el RER y una doble banda en los lisosomas. Esto pensamos podría sugerir que en su localización lisosomal final, la cruzipaína está en forma madura e inmadura, mientras que en una posición previa se encuentra sólo una proforma (banda superior), como se propone para otras enzimas de la

superfamilia de la papaína, como la procatepsina B (29). Se propone en realidad una forma intermedia de proenzima pues ambas presentan actividad gelatinolítica, mientras se supone que una proforma completa no debería tener actividad, al ser el dominio pro un inhibidor natural de las proteasas.

3.3 Carboxipeptidasas

Las serín carboxipeptidasas se encuentran ampliamente distribuidas entre los hongos, las plantas superiores y los animales (30 - 35). Pertenecen a la familia S10 de las Carboxipeptidasas C. Esta familia incluye a la carboxipeptidasa C propiamente dicha, la carboxipeptidasa Y, la carboxipeptidasa tipo Y, la carboxipeptidasa A lisosomal, etc. (30).

| Peptidasa | EC | Código en base de datos |
|--|----------|---|
| Family S10: Carboxypeptidase C | | |
| Carboxypeptidase C (forms I and III) | 3.4.16.5 | CBP1_HORVU, CBP3_*, (D10985), (D17586) |
| Carboxypeptidase D | 3.4.16.6 | KEX1_YEAST, CBP2_* |
| Carboxypeptidase Y (<i>Saccharomyces</i>) | 3.4.16.1 | CBPY_*, (D10199) |
| Carboxypeptidase Y-like protein (<i>Arabidopsis</i>) | - | CBPX_ARATH |
| Carboxypeptidase Y-like protein (rice) | - | (D17587) |
| Lysosomal carboxypeptidase A | 3.4.16.5 | PRTP_* |
| Serine-type carboxypeptidase (<i>Caenorhabditis</i>) | - | (M75784) |
| Serine-type carboxypeptidase (<i>Aedes</i>) | - | (M79452) |
| Virulence-related protein (<i>Naegleria</i>) | - | (M88397) |

Figura 3. Peptidasas de la familia de la Carboxipeptidasa C (S10)

Como muchas proteinasas son sintetizadas como pre-pro-enzimas consistentes en un péptido señal típico, seguido por un propéptido (que participa en la inhibición y el plegamiento) y la proteína madura. Suelen tener PM aparentes de subunidades entre 45 y 75 kDa. Son enzimas glicosiladas en distinto grado, con puentes disulfuro y sulfidrilos libres, monoméricas o multiméricas pero sin que ello influya en la actividad (30). Presentan

actividades de dipeptidasas y en general también de esterasas. Son inhibidas por diisopropilfluorofosfato, inhibidor específico de serín proteasas, y presentan la triada catalítica Ser/Asp/His (30).

En todos los organismos en los que aparecen podrían desempeñar varias funciones. Al ser enzimas vacuolares o lisosomales participan en el recambio general de proteínas, y como enzimas extracelulares, clivan aminoácidos necesarios para la nutrición a partir de péptidos y proteínas externas (30).

Funciones más específicas fueron descriptas para el procesamiento proteolítico, la regulación de los niveles de hormonas peptídicas y, en complejos con la β -galactosidasa y la neuraminidasa, son descriptas como proteínas protectoras requeridas para el ensamblaje de la partícula funcional (30). Su ausencia como proteína protectora provoca en humanos una patología conocida como galactosialidosis, que ha originado muchos trabajos de investigación.

Además, algunas proteasas pueden permitir la introducción de estructuras no codificadas por los genes como ser la introducción de grupos amida. Las exopeptidasas pueden catalizar específicamente modificaciones en la parte terminal de péptidos y proteínas sin clivajes internos. Entre ellas, las serín carboxipeptidasas son muy útiles para estos fines. Por ejemplo, en reacciones de transpeptidación catalizadas por serín carboxipeptidasas, un nucleófilo adicionado específicamente reemplaza el aminoácido del carboxilo terminal. Esta propiedad ha sido aplicada para el marcado radioactivo de péptidos y proteínas, la amidación C-terminal de precursores de hormonas y la alteración de secuencias C-terminales de péptidos. Estas capacidades posibilitan la utilización con fines biotecnológicos de este tipo de enzima para la secuenciación C-terminal de proteínas y la síntesis de péptidos (36).

En base a las numerosas funciones y aplicaciones que se proponen para las serín carboxipeptidasas en general, y la novedad de su presencia en un agente patógeno como el

T. cruzi, causante de la enfermedad de Chagas (27), creemos que puede resultar importante su presencia en el parásito. Por otro lado, hasta el momento su presencia quedaba enmascarada por otra enzima, la cruzipaína, con la cual copurifican cuando se emplea la cromatografía de afinidad en Con-A Sefarosa. Siendo la cruzipaína la cisteína proteinasa principal en el parásito (27), y habiéndosela investigado detalladamente, es posible que algunas de las propiedades descriptas después de la introducción de dicha cromatografía de afinidad puedan corresponder en realidad a la carboxipeptidasa. Resulta pues necesario realizar una discriminación referida a las propiedades que le corresponden a cada una en particular.

Objetivos

Los objetivos del trabajo plantean:

- A) Investigar la presencia de carboxipeptidasas en *Trypanosoma cruzi*.
- B) Realizar una purificación parcial de la carboxipeptidasa hallada.
- C) Caracterizar la enzima bioquímicamente.
- D) Distinguir su actividad de la de la cruzipain, principal cisteína proteinasa del parásito con la cual hasta el momento copurificaba en la etapa de Con-A Sefarosa.

Materiales y Métodos

1. Purificación de la carboxipeptidasa

1.1 Preparación del extracto libre de células

La enzima fue purificada de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen, Tul 2.

Los epimastigotes se crecieron en estufa a 28°C, en un medio axénico descripto por Cazzulo y colaboradores (37). Su composición en g/l es:

| | |
|---|------|
| Infusión de cerebro – corazón | 33 |
| Triptosa | 3 |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 4 |
| KCl | 0.4 |
| Glucosa | 0.3 |
| Hemina | 0.02 |

pH 7,2 – 7,4

Antes de ser utilizado se agregan: suero fetal bovino inactivado (10% concentración final); penicilina 100 U/ml; y estreptomicina 100 µg/ml. Los cultivos se mantienen en volúmenes no mayores a 5 ml. Para la obtención de epimastigotes se trabaja con cultivos no menores de 100 ml.

5 g de las células fueron cultivadas, cosechadas y lavadas como se describe previamente (37). Los epimastigotes fueron lisados por tres ciclos de congelado a -20°C y descongelado a temperatura ambiente, el primero de los cuales es un congelamiento a -20°C durante toda la noche.

Luego de esto, el precipitado fue resuspendido en 12,5 ml de TBS (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM).

El homogenato fue centrifugado a 11000 rpm en el rotor SS-34 de una centrífuga Sorvall RC-5B durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y el precipitado fue resuspendido en otros 12,5 ml de TBS. Luego de centrifugarlo nuevamente en idénticas condiciones, ambos sobrenadantes fueron centrifugados juntos durante 30 minutos, a 19000 rpm a 4°C. El sobrenadante libre de células de esta última centrifugación (25 ml) fue conservado y el precipitado descartado.

1.2 Cromatografía de afinidad de ConA-Sefarosa

El sobrenadante fue adicionado con 5 mM de CaCl₂, MnCl₂ y MgCl₂. Se guardó una alícuota para futuras mediciones y el resto fue aplicado a una columna de ConA-Sefarosa equilibrada con TBS y 2 mM de los mismos cationes, luego de ser lavada con TBS. Se percoló la muestra centrifugada 3 veces a 4°C y se dejó acoplando durante toda la noche a esa temperatura. Al día siguiente se lavó con el buffer TBS y cationes y luego se le aplicó TBS con 0,5 M de α-metil-manósido y se lo incubó 1 hora a 37°C para equilibrarla. Finalmente se eluyó la columna con el α-metil-manósido a 37°C. Los primeros 28 ml del eluido fueron dializados durante toda la noche contra Tris/HCl 5 mM, pH 7,6.

Se guardó una alícuota luego de la dialisis para medición de proteínas y actividad.

1.3 Cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q

La muestra eluida de la Con-A Sefarosa dializada y centrifugada (39 ml), fue aplicada a una columna Mono Q 10/10 equilibrada con Tris/HCl 50 mM, pH 7,6 y 1 mM EDTA, en un aparato de FPLC™ AKTA Purifier, Pharmacia, Biotech. Luego de un lavado exhaustivo, la muestra fue eluida con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en el mismo buffer, a un flujo de 2 ml/min, fracciones de 0,5 ml y un volumen total de 100 ml.

1.4 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

Muestras con 1 M de sulfato de amonio fueron sembradas en la columna hidrofóbica Phenyl Sepharose High Performance equilibrada con 1 M sulfato de amonio en agua Milli-Q. La columna fue corrida con un gradiente lineal desde 1 a 0 M de sulfato de amonio, a una velocidad de 0,4 ml/min y un volumen total de 5 volúmenes de columna.

1.5 Filtración molecular en Superdex 75

Se utilizó una columna de Superdex 75, corrida en un equipo de FPLC™ AKTA Purifier. La columna fue sembrada con 200 µl de muestra. Las condiciones de corrida fueron velocidad de 0,5 ml/min, volumen total de 100 ml y fracciones de 1 ml. El buffer utilizado fue el mismo que para la Mono Q, Tris/HCl 50 mM, pH 7,6 y 1mM EDTA.

2. Evaluación de la purificación

Las fracciones que presentaban absorbancia positiva a 280 nm, así como las alícuotas del extracto libre de células y la Con-A Sefarosa, fueron evaluadas por electroforesis en gel y por medición de actividad enzimática.

2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

PAGE fue llevado a cabo en minigeles (7 x 8,5 cm, 1 mm de espesor) de 12,5% de acrilamida:bis-acrilamida, en presencia de 0,1% SDS, de acuerdo a Laemmli (38). Las muestras con cracking buffer 1X, DTT 10 mM, hervidas 2 minutos a 100°C, fueron corridas a 150V, en paralelo a marcadores de peso molecular (seroalbúmina bovina de 66 kDa, ovoalbúmina de 45 kDa y pepsina de 34,7 kDa) y un marcador preteñido de 32 kDa

(triosafosfato isomerasa), hasta que éste último se encuentra a 1,5 cm del final del gel. En ausencia de éste se corre hasta la salida del frente. En otras oportunidades se usó una mezcla de marcadores de miosina (205 kDa), β -galactosidosa (116 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa).

Los geles fueron teñidos para proteínas con Coomasie Brilliant Blue R-250 0,2% en metanol/ácido acético/agua (50:7:43 v/v/v) durante 20 minutos en agitación constante suave. Los geles fueron destañidos con metanol/ácido acético/agua 50:10:40 v/v/v.

Para los casos en que la concentración de proteína era menor, se utilizó la tinción con nitrato de plata de mayor sensibilidad. En este caso a un lavado con metanol/ácido acético/agua bidestilada 50:10:40 v/v/v de 15 minutos se le agrega un paso más de lavado con una solución de metanol/ácido acético/agua bidestilada 7:5:88 v/v/v durante 15 minutos. Luego de esto se fijan los geles durante 20 minutos con aproximadamente 50 ml de una solución de glutaraldehído 10%. Se lava luego exhaustivamente con abundante H₂O destilada hasta eliminar todo rastro del fijador (1 a 2 horas). Se incuban entonces los geles con una solución de nitrato de plata amoniacial (AgNO₃ 0,8%, NaOH 0.04 N, NH₃ 1.4% en H₂O destilada) durante 15 minutos. Antes de revelar se lava con H₂O destilada durante 15 minutos. El revelado se lleva a cabo por el agregado de 50 ml de una solución de ácido cítrico 0.06 mg/ml, conteniendo formaldehído al 0.02%. La reacción se detiene por lavados con 10% de ácido acético en H₂O destilada. El proceso se realiza con agitación suave.

2.2 Medición de actividades

2.2.1 Actividad de carboxipeptidasa

La actividad de carboxipeptidasa fue seguida por la hidrólisis del sustrato cromogénico sintético N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Phe-Phe (FA-Phe-Phe) disuelto en metanol

(concentración final 0,2 mM), con 955 µl de acetato/ácido acético 50 mM, pH 5 en presencia de 1mM de EDTA. Se usaron habitualmente 20 µl de muestra. El curso de la reacción fue seguido espectrofotométricamente por la disminución de absorbancia a 337 nm (**30**), usando un coeficiente de extinción de $2000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de sustrato por minuto.

2.2.2 Actividad de cruzipaína

La actividad de cruzipaína fue determinada con el sustrato cromogénico sintético Bz-Pro-Phe-Arg-pNA (**39**) a pH 8, en presencia de 10 mM 2-mercaptopetanol. El curso de la reacción fue seguido espectrofotométricamente por el aumento de absorbancia a 410 nm. La unidad enzimática se define como para la actividad de carboxipeptidasa.

En base a lo observado en los geles y las medidas de actividades, se agruparon las fracciones de acuerdo a si presentaban actividad de carboxipeptidasa o cruzipaína o ambas.

Las fracciones de cruzipaína pura fueron dializadas exhaustivamente contra Tris/HCl 5 mM, pH 7,6 y concentradas con polietilenglicol 10000.

2.3 Medición de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de las fracciones activas obtenidas luego de cada etapa de purificación por el método de Bradford (**40**).

Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un aparato Spectronic Genesys 5.

3. Caracterización parcial de la enzima

3.1 Peso molecular aparente de subunidad por SDS-PAGE

Con la enzima parcialmente purificada, se determinó su peso molecular aparente de subunidad en gel de SDS-PAGE 12,5%, en condiciones reductoras con DTT, comparando contra marcadores de peso molecular conocido: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

Luego de ser teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250, se midió la distancia recorrida desde el gel separador por la enzima y los marcadores de peso molecular. Se graficaron las distancias recorridas en función del logaritmo del peso molecular.

3.2 Presencia de puentes disulfuro

Se evaluó la presencia de puentes disulfuro en geles de SDS-PAGE 12,5% teñidos por Coomasie Brilliant Blue R-250 de muestras hervidas 2 minutos en condiciones reductoras (Cracking buffer 1X, DTT 100 mM) y no reductoras (Cracking buffer 1X).

3.3 Glicosilación

Se estudió la presencia de N-glicosilación mediante una digestión por endo- β -N-acetilglucosaminidasa H. La enzima purificada (0,68 μ g) fue disuelta en 40 μ l de Tris/Acetato 0,4 M, pH 5, con el agregado de 0,5% de SDS (concentración final). Luego de adicionar 4 mU de endo- β -N-acetilglucosaminidasa H, la mezcla fue incubada durante 4 días a 37°C. La muestra fue sometida a SDS-PAGE como describe Laemmli (38). Un control sin tratar con endo H fue corrido simultáneamente.

Para corroborar la presencia de azúcares, una muestra tratada y otra no tratada con endo H fueron sometidas a SDS-PAGE y teñidas con la coloración específica para azúcares PAS. Esta coloración requiere de la incubación del gel en solución de fijación metanol/ácido acético/agua 50:10:40 v/v/v durante 15 minutos en agitación suave, seguida de otra solución de fijación metanol/ácido acético/agua 20:10:70 v/v/v en iguales condiciones. Se incuba luego 1 hora en 100 ml de una solución de periodato (0,7g de periodato en 100 ml de una solución 5% de ácido acético). Se lava con H₂O y se adicionan 50 ml de una solución de *meta*-bisulfito (0,2 g de *meta*-bisulfito de sodio en 100 ml de una solución 5% en ácido acético). El gel se tornará amarillo lentamente. Luego de 5-10 minutos se cambia por 50 ml de solución fresca de *meta*-bisulfito, y se deja hasta que se decolora (5-10 minutos). Finalmente se coloca el gel en el reactivo de Schiff y se incuba hasta la aparición de bandas rojas (0.5-2 horas). Luego de 2 horas no suele verse un aumento de intensidad en la tinción; sin embargo, en este caso el gel fue incubado toda la noche en el reactivo para lograr una buena coloración. Se decolora con metanol/ácido acético/agua 20:10:70 v/v/v.

4. Determinación de la actividad enzimática

4.1 Especificidad de sustrato

Se ensayó la actividad frente a distintos sustratos que permitan caracterizar la actividad de la enzima como carboxipeptidasa (N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Phe-Phe (FA-Phe-Phe), N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Ala-Lys (FA-Ala-Lys)) y como esterasa (N-Acetyl-L-Fenilalanil Etil Éster (APEE), N-Acetyl-L-Tirosina Etil Éster (ATEE)) en condiciones adecuadas.

La medición de la actividad de carboxipeptidasa se realizó en las condiciones especificadas anteriormente, con la diferencia que el sustrato FA-Ala-Lys necesita 70% metanol y 30% agua para disolverse.

Para la actividad esterasa se ensayó frente a los sustratos N-Acetyl-L-Fenilalanina Etil Éster (APEE), N-Acetyl-L-Tirosina Etil Éster (ATEE) en concentraciones de 5 mM y 1 mM respectivamente, en metanol 25% y buffer fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.5, 75%. A 1 ml de la solución de sustrato y 1 ml del mismo buffer se lo equilibra 5 minutos a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia a 237 nm para ATEE y 230 nm para APEE a ambas soluciones. La reacción se inicia agregando 5 µl, 20 µl y 50µl de la muestra de enzima a la solución de sustrato.

Se utilizó también un método muy simple y a la vez sensible para la detección de proteasas en geles de poliacrilamida con SDS. Éste se basa en la incorporación de un sustrato proteico (en este caso gelatina) a la matriz de poliacrilamida (41) y en la hidrólisis de ese sustrato llevada a cabo por las proteasas hasta péptidos de tamaño suficiente como para ser liberados del gel durante los lavados del mismo. De esta manera, en la zona del gel donde se encuentra la enzima, después de la tinción, se visualiza una banda decolorada sobre un fondo de color dado por el Coomasie Brilliant Blue R-250.

Ya que la fijación del sustrato a la acrilamida es de tipo no covalente, se necesita un gel con alta concentración de acrilamida, junto con sustratos de alto peso molecular, para prevenir la migración durante la electroforesis. Las corridas con gelatina incorporada se efectuaron en minigeles con concentraciones de acrilamida:bis-acrilamida de 12,5% (38). La gelatina se agregó a la solución en una concentración de 0,1% La corrida duró hasta que el marcador coloreado de 32 kDa llegó a 1,5 cm del borde inferior del gel y se llevó a cabo a temperatura ambiente. Una vez finalizada, se hicieron 2 lavados de 15 minutos con H₂O bidestilada. Con estos lavados se busca eliminar el SDS y permitir así la renaturalización de la enzima, que es sembrada sin reducir ni hervir para evitar su desnaturalización irreversible. Luego los geles se incuban a 37°C durante 1 hora y media en MES 0,1 M, pH 6 y 0,5 mM DTT. Finalmente, se lava el gel con H₂O bidestilada y se tiñe con Coomasie Brilliant Blue R-250, deteniendo la reacción. Una vez decolorado con metanol/ácido

acético/agua 50:10:40 v/v/v, pueden verse las bandas de actividad incoloras sobre el fondo azul.

Para el ensayo con inhibidores, durante la incubación a 37°C se adiciona 50 µM de E-64, 1 mM de PMSF y 5 mM o-fenantrolina al medio de reacción en recipientes separados a porciones de gel con iguales muestras sembradas.

Cabe aclarar que para que resultara comparable el ensayo, se sembraron iguales cantidades de cada enzima, aproximadamente 0,375 µg.

4.2 Caracterización de la actividad en función del pH

Para el sustrato con que se observó actividad (FA-Phe-Phe), se realizó una caracterización de la actividad a distintos valores de pH. La reacción se midió como se describe anteriormente para la actividad de carboxipeptidasa.

Se utilizaron diferentes amortiguadores: Acetato/Ac. Acético 50 mM, pH 4; 4,5; 5; 5,5 y 6; Tris/Aacetato 50 mM, pH 5 y 7,44 y Tris/HCl 50 mM, pH 6,8.

Luego de la reacción se midió el valor real de pH dado por la mezcla total de reacción mediante el uso de un pHmetro ORION, modelo 210A.

4.3 Patrón de inhibición

Se estudió el efecto de los distintos inhibidores indicados en la sección 3.3 Resultados sobre la actividad con FA-Phe-Phe. Los mismos se usan en las concentraciones detalladas en la tabla.

La metodología aplicada consistió en una incubación durante 5 minutos a

temperatura ambiente de 20 μl de la enzima con el inhibidor en el medio de reacción sin sustrato (como se especifica antes). La reacción se inició con el agregado del sustrato sintético FA-Phe-Phe. Se realizó un control de actividad con la enzima incubada en las mismas condiciones en ausencia de inhibidores y presencia del solvente en que se disuelve el inhibidor, a igual concentración. También se realiza un control de incubación de la enzima durante 15 minutos a temperatura ambiente en ausencia de sustrato. Se determina el porcentaje de inhibición con respecto al control.

5. Estudios cinéticos

5.1 Parámetros cinéticos

Utilizando FA-Phe-Phe en concentraciones 0.04 mM, 0.12 mM, 0.2 mM y 0.4 mM, se obtuvieron los valores de K_m , K_{cat} y V_{max} , con Acetato/Ac. Acético 50 mM, pH 5.

6. Localización subcelular

Se buscó la localización de la carboxipeptidasa en el parásito mediante un ensayo con digitonina, un detergente que reacciona con el colesterol de la bicapa, alterándola y permeabilizándola.

Epimastigotes de Tul 2 fueron tratados con digitonina en tubos Eppendorf de microcentrifuga como se describe en (42).

La localización se probó por medio de la medición de la actividad de carboxipeptidasa, según el protocolo antes descripto, en las fracciones provenientes del sobrenadante y el precipitado del tratamiento con digitonina. Su ubicación se determina por comparación de las curvas que presentan enzimas marcadoras de las distintas organelas celulares. Como marcador citosólico, se utilizó la enzima málica NADP dependiente

activada por L-aspartato; como marcador glicosomal, la hexoquinasa. Estos marcadores fueron ensayados como se describe en (42). Como marcador lisosomal se utilizó la cruzipainá (antes descripta).

El valor de actividad para el precipitado a 0% de digitonina, se tomó como el 100% de actividad. Las mediciones se calcularon como porcentaje de esa actividad máxima, para cada enzima medida.

7. Secuenciación

7.1 Secuenciación del extremo N-terminal

Usando minigeles de 12,5 % de acrilamida:bis-acrilamida y de 1 mm de espesor, se corrieron varias muestras, sembradas con cracking buffer 1X, DTT 10 mM, hervidas 2 minutos a 100°C. El gel se equilibra en el buffer de transferencia durante 5 minutos; una membrana de PVDF se coloca en metanol durante unos segundos; se electrotransfiere el gel a 15 V durante 40 minutos en semi-seco, en buffer CAPS 1X (CAPS en agua deionizada a pH 11 con NaOH) y 10% metanol.

Luego de la transferencia, la membrana se enjuaga primero con agua deionizada, se satura después en metanol 100% por unos segundos y finalmente se colorea con Coomasie Brilliant Blue R-250 0.1%, en metanol 40% y ácido acético 1%. Las bandas aparecen en segundos y luego se destiñe con metanol 50%. Se enjuaga finalmente en agua y se recortan las bandas de interés. Esta coloración es para evitar el bloqueo N-terminal por acetilación.

Las muestras fueron enviadas al LANAIS-Pro para ser secuenciadas.

7 .2 Secuenciación de péptidos internos

Usando minigeles de 12,5 % de acrilamida:bis-acrilamida y de 1 mm de espesor, se corrieron varias calles con las muestras. Dichas muestras con cracking buffer 1X y DTT 10 mM, fueron hervidas 3 minutos a 100°C y luego enfriadas a temperatura ambiente. Se le agrega entonces iodoacetamida 20 mM de concentración final y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Se siembra un gel SDS-PAGE 12,5% y se corre a 150 V. Se tiñe con reactivos de la mejor calidad por Coomasie Brilliant Blue R-250. Se recortaron las bandas de interés: I, II, III y IV.

Las muestras fueron enviadas a Suecia para el posterior procesamiento de digestión tríptica *in gel* (43). La mezcla de péptidos fue sometida a MALDI-TOF. Esta técnica consiste en colocar la muestra junto a una matriz absorbente de luz UV, que mezcladas y secadas generan cristales de la misma. Estos cristales son irradiados con un pulso láser de luz UV en el espectrómetro de masa. La sublimación de los cristales produce la formación de una fase gaseosa, iones moleculares protonados desde el sólido. El analizador de masa separa los iones moleculares basados en relación masa/carga (m/z). MALDI se combina generalmente con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF). Los iones son acelerados hasta una energía cinética de aproximadamente 25 keV y luego se los deja volar en un campo libre a lo largo de una distancia fija de un metro aproximadamente, antes de ser registrados por la señal eléctrica que generan por impacto en un detector. El tiempo de vuelo se relaciona con la relación m/z de un ion determinado. Teniendo igual energía cinética, iones de moléculas pequeñas se mueven más rápido que iones de moléculas grandes. Se los distingue entonces por el menor tiempo que tardan en llegar al detector. La relación m/z para un ion puede ser determinada por su tiempo de vuelo por comparación con el TOF de patrones. Una ventaja del analizador TOF es que puede detectarse de una vez una población total de iones, lo que da alta sensibilidad al método. Sin embargo, este método resulta más efectivo con masas proteicas elevadas, que escasas. Por otro lado, si

bien no hay teóricamente una limitación en el tamaño de los iones, los grandes se mueven más lento y no son detectados tan eficientemente como los pequeños, que son iones más rápidos y generan una señal más fuerte al impactar en el detector. El rango práctico de masa para MALDI-TOF es desde 500 Da hasta 150000 Da (44).

En base a los resultados, se realizó luego un aislamiento de péptidos puros de la mezcla peptídica según (43). Para dicho aislamiento, la mezcla fue cromatografiada en un sistema de HPLC en fase reversa. Dicho aparato cuenta con un detector de péptidos que registra absorbancias a 215 nm (enlaces peptídicos), 254 nm (Cys piridiletilada) y 280 nm (Trp y en mucho menor grado Tyr). De esta manera se pueden seleccionar péptidos en general o aquellos que en particular posean determinado tipo de aminoácidos. Los péptidos se seleccionan por dos criterios: homogeneidad y cantidad.

Los péptidos seleccionados fueron nuevamente sometidos a MALDI-TOF y a secuenciación por Edman.

Todo esto se llevó a cabo en el Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch, Uppsala, Suecia, gracias a la colaboración del Dr. Ulf Hellman , el Ing. Christer Wernstedt y la Lic. Fabiola Parussini.

8. Obtención de anticuerpos específicos

Utilizando las bandas recortadas de gel de SDS-PAGE de la carboxipeptidasa (banda por debajo del marcador de 66 kDa) y de la cruzipaína (madura –banda por sobre marcador de 45 kDa- y C-terminal –banda menor a 36 kDa-) por separado, y sirviendo el gel como adyuvante, se pulverizó él mismo por congelación en N₂ líquido. Luego se resuspendieron las muestras en 900 µl de PBS estéril y se obtuvieron anticuerpos específicos por inmunización intraperitoneal de ratones, mediante una inyección de aproximadamente 10µg de cada enzima, aplicada en dos veces, en intervalos de 15 días

entre cada aplicación. Para lograr una buena masa proteica, las muestras debieron ser concentradas antes de someterlas a electroforesis por speed-vac a baja temperatura, luego de dialisarlas para sacarles la sal. La muestra de cruzipáina fue además adicionada con E-64 5 µM para que no se autoproteolice y quede dominio catalítico para inyectar.

Luego de un mes, los ratones fueron sangrados a blanco por el ojo y se obtuvieron los sueros correspondientes.

Dichos anticuerpos fueron utilizados para tratar de discriminar la inmunogenicidad de ambas enzimas en ensayos de Western blot.

9. Western blots

Usando minigeles de 12,5 % de acrilamida:bis-acrilamida y de 0,75 mm de espesor, se corrieron cantidades iguales (0.5 µg) de las diferentes muestras, sembradas con cracking buffer 1X, DTT 10 mM, hervidas 2 minutos a 100°C. Las muestras se corrieron hasta que un marcador preteñido de alrededor de 30 kDa se encontraba a 1,5 cm del final del gel. El gel entonces fue electrotransferido en condiciones semi-secas a un filtro de nitrocelulosa, durante 40 minutos a 15 V. Se corroboró la transferencia con tinción con Rojo Ponceau, lo que permitió también señalar los marcadores de 66, 45 y 34,7 kDa.

El filtro fue lavado más tarde con TBS e incubado con TBS + 3% albúmina + 2% glicina durante 30 minutos para bloquear el filtro e impedir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Posteriormente, se incuba con el suero disponible en el laboratorio diluido 1/1000 en la misma solución y los obtenidos de los ratones se utilizaron en una dilución 1/500. Luego de sucesivos lavados con TBS (2 lavados de 10 minutos cada uno), TBS + 0,05% Nonidet P-40 (un lavado de 10 minutos) y TBS nuevamente (dos lavados de 10 minutos cada uno), el gel se incubó por 1 hora con suero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/20000 en TBS leche) para el caso de un suero anti-C-terminal con el

que se contaba ya en el laboratorio y con anti-ratón conjugado a igual enzima (1/2500 en TBS leche) para el caso de los sueros preparados por nosotros. Luego de nuevos lavados de 10 minutos como antes con TBS, TBS + 0,1% Nonidet P-40 y TBS respectivamente, se equilibraron los filtros incubándolos durante 5 minutos en 10 ml de buffer para fosfatasa alcalina (Tris/HCl 0.1 M, pH 8,8 + NaCl 0.1 M + MgCl₂ 50 mM). El revelado se llevó a cabo con el agregado de 100 µl de NBT (30 mg/ml en 70% formamida) y BCIP (15 mg/ml en dimetilformamida). La reacción se detiene con lavados en agua destilada.

10. Dot blots

Para ensayar la cantidad de proteína y la dilución de los anticuerpos necesaria para el ensayo de Western blot, trozos de nitrocelulosa fueron sembrados con 0.23 µg y 0.5 µg de proteína. Sobre estos filtros se ensayó una dilución 1/50 y 1/500 de los sueros obtenidos de ratón, y se usó como control el suero anti C-terminal de conejo en una dilución 1/1000. El bloqueo, tratamiento de lavado y con sueros y el revelado se realizó como se indica en la sección anterior de **Materiales y Métodos**.

Reactivos

Los reactivos, sustratos, inhibidores, marcadores de PM, etc. utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co; acrilamida y bisacrilamida, de Merck. Los restantes reactivos utilizados son analíticos y de la mayor pureza accesible en el mercado.

Resultados

Intrigados por la posibilidad de encontrar una proforma parcialmente procesada de la cruzipain en la banda superior del patrón que presentaba tradicionalmente la enzima (esquema página 15), nos encontramos con la presencia de una actividad proteolítica de otra naturaleza. Dicha actividad surgió luego de la secuenciación de péptidos obtenidos por digestión tríptica *in gel* de dicha banda, ya que por hallarse bloqueada en el extremo N-terminal, impedía la obtención de una secuencia por la aplicación directa del método de Edman. Por lo tanto, el método de purificación tradicional de la cruzipain proporcionaba por lo menos una proteína adicional con la cual copurificaba y quedaba enmascarada en la secuenciación tradicional.

1. Purificación de la carboxipeptidasa

Basándonos en el método tradicional de purificación de la cruzipain, que necesitaba de modificaciones para separar la actividad carboxipeptidasa de la actividad de cisteína proteinasa, luego de realizada una columna de afinidad para azúcares, se realizó una de intercambio aniónico. Las condiciones resultaron similares a las usadas para separar isoformas de la cruzipain. De esta columna se obtuvieron tres grupos de fracciones en base a la medición de actividades y corridas en geles de las fracciones (**Figura 6**):

- GRUPO 1: fracciones 84 a 89, carboxipeptidasa muy enriquecida (3ml)
- GRUPO2: fracciones 90 a 98, mezcla de carboxipeptidasa y cruzipain, que copurifican aún en las condiciones utilizadas (4,5 ml)
- GRUPO 3: fracciones 106 a 134, cruzipain altamente activa (14.5 ml)

ACTIVIDADES

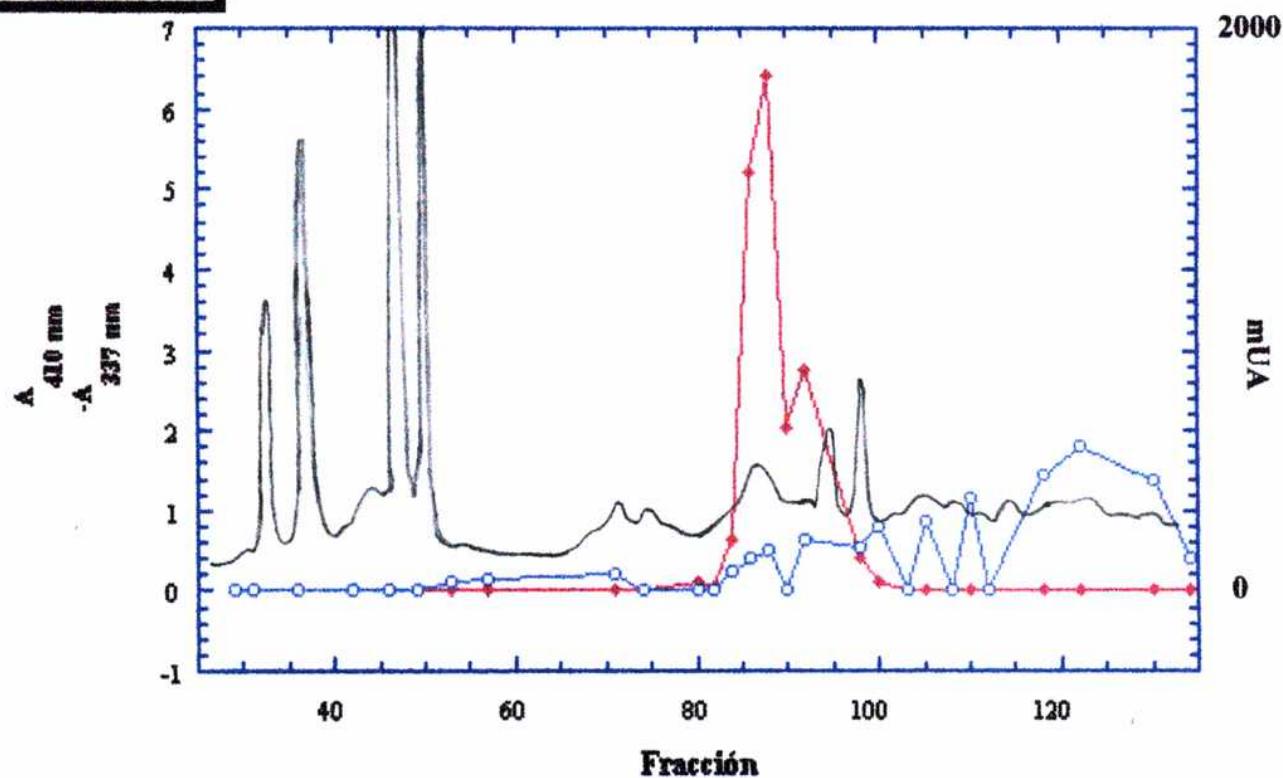
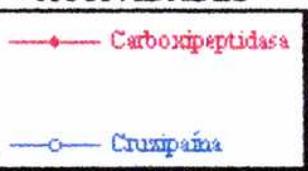


Figura 6a. Perfil proteico y de actividad de carboxipeptidasa y cruzipain ($\Delta A/\text{ml min}$) para las fracciones de la columna Mono Q.

La corrida cromatográfica y medición de actividades se realizaron como se describe en 1.3 y 2.2 de Materiales y Métodos, respectivamente.

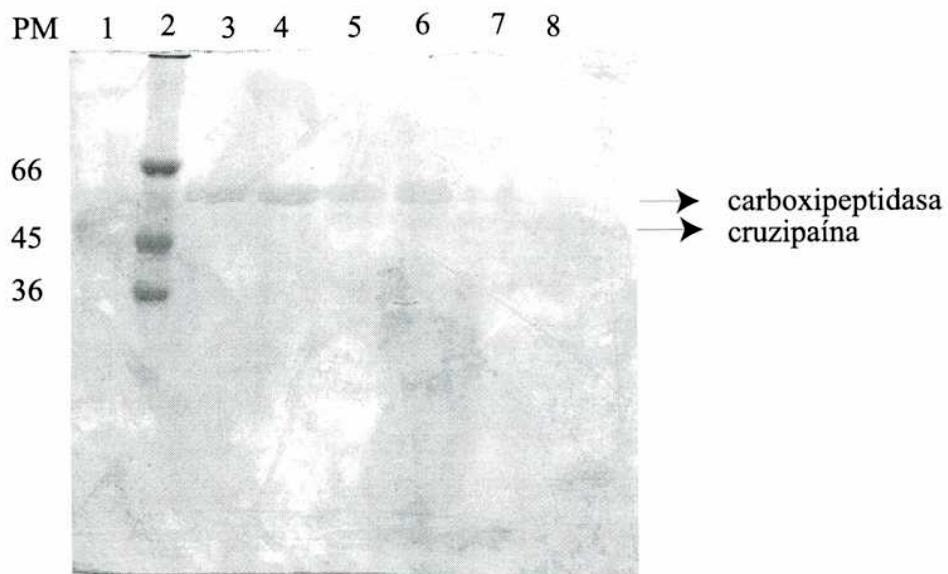


Figura 6b. Fracciones provenientes de la Mono Q.

Calle 1: Fracción 82; calle 2: Marcadores moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 36 kDa; calle 3: Fracción 86; calle 4: Fracción 88; calle 5: Fracción 90; calle 6: Fracción 92; calle 7: Fracción 98; calle 8: Fracción 100.
Gel teñido por nitrato de plata.

La corrida se realizó como se describe en 2.1 de Materiales y Métodos.

La **Figura 7** muestra que se logró un enriquecimiento apreciable de la carboxipeptidasa en las condiciones utilizadas en la Mono Q para el primer y segundo grupo de fracciones, en un gel teñido por Coomassie Brilliant Blue R-250. Un gel con las mismas fracciones teñido por plata en la **Figura 8**, muestra rastros de la cruzipaína, pero en cantidad despreciable comparada a la carboxipeptidasa, sobre todo para el grupo 1. La banda inferior correspondería a la cruzipaína, mientras que la banda superior (que es a su vez doble, aunque no se visualiza claramente en la foto), corresponde a la carboxipeptidasa.

Las distintas intensidades de las bandas correspondientes a ambos grupos se debe a que se sembraron distinta cantidad de proteínas, e incluso teniendo más cantidad de proteína, la primera fracción casi no muestra presencia de cruzipaína.

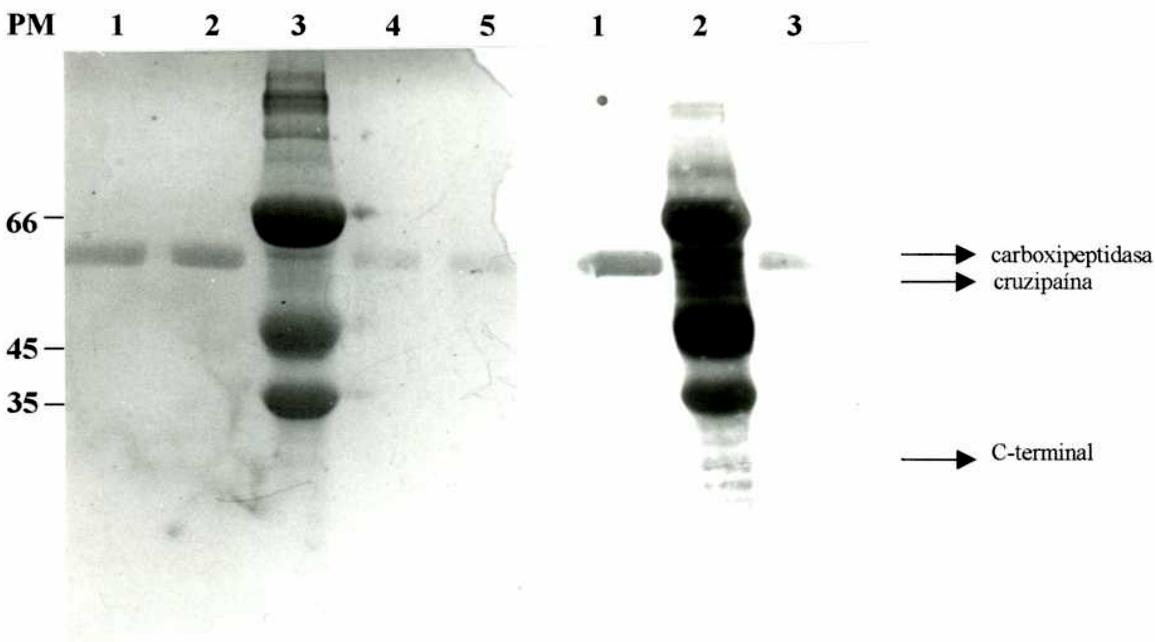
**Figura 7****Figura 8**

Figura 7. Grupos de fracciones provenientes de la Mono Q.

Calles 1,2: Grupo 1 de fracciones (0,365 µg en 21 µl); calle 3: Marcadores moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 35 kDa; calles 4,5: Grupo 2 de fracciones (0,265 µg en 21 µl). Gel teñido por Coomassie Brilliant Blue R-250.

Figura 8. Grupos de fracciones provenientes de la Mono Q.

Calle 1: Grupo 1 de fracciones (0,365 µg en 21 µl); calle 2: Marcadores moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 35 kDa; calle 3: Grupo 2 de fracciones (0,265 µg en 21 µl). Gel teñido por nitrato de plata.

La corrida se realizó como se describe en 2.1 de Materiales y Métodos.

Sin embargo, la medición de actividades no presenta interferencias entre la enzima de interés y la cruzipaína remanente que pudiera haber. Esto fue corroborado para los grupos de fracciones utilizando E-64 y registrando la actividad de carboxipeptidasa sin disminución con respecto a un control no tratado con inhibidor de cisteína proteinasas. Por el contrario, la actividad de cruzipaína se inhibe totalmente con E-64, usando Bz-Pro-Phe-Arg-pNA como sustrato (Datos no mostrados).

En base a esto, los posteriores ensayos se hicieron sobre el grupo 1 de fracciones, por ser el más Enriquecido en la enzima de interés.

La concentración de proteínas de las fracciones activas obtenidas luego de cada columna fue determinada por el método de Bradford. Con los valores de actividad de carboxipeptidasa para el primer y segundo grupo de fracciones se realizó el cuadro de purificación (**Cuadro 1**). La **Figura 9** muestra un gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250 con los pasos de purificación realizados, mostrando a la carboxipeptidasa en el grupo 1 y la cruzipain en el 3. El grupo 2 no se muestra pero sería una suma de la calle 3 y 4.

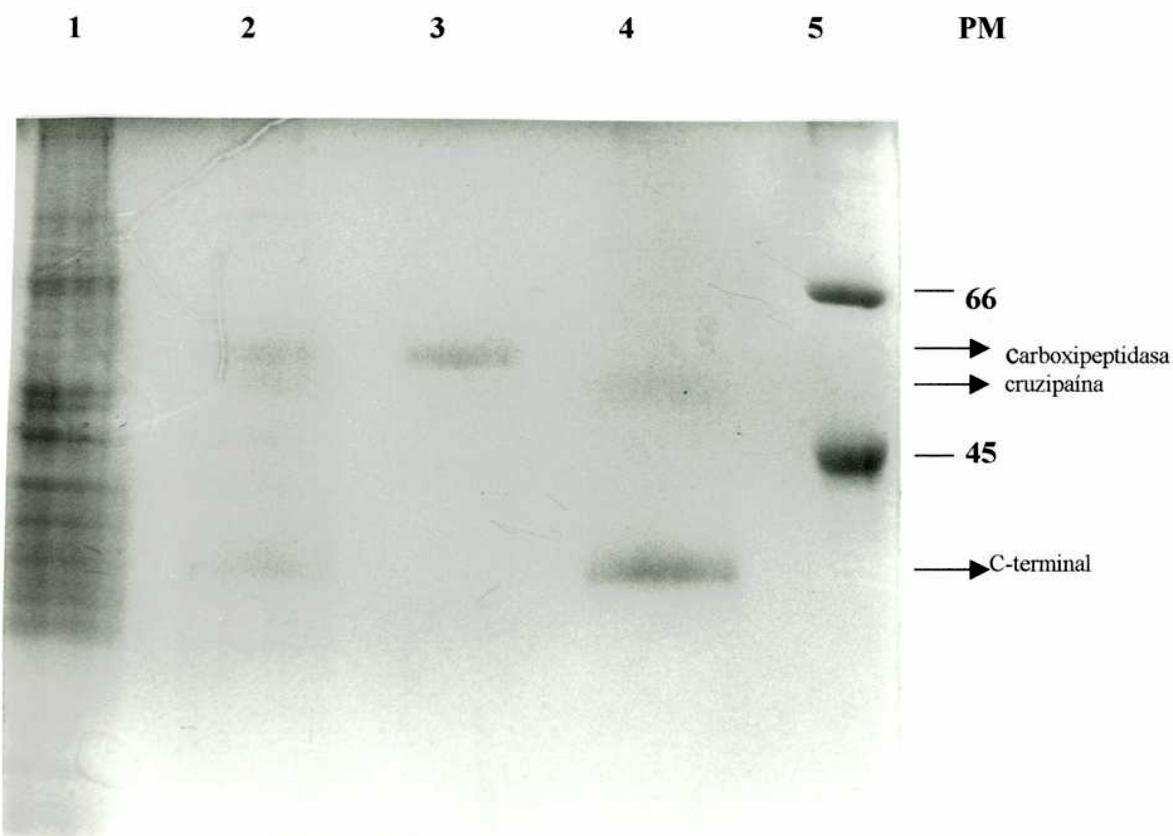


Figura 9. Pasos de purificación.

Calle 1: Extracto libre de células; calle 2: Con-A Sefarosa; calle 3: Grupo 1 de fracciones; calle 4: Grupo 3 de fracciones; calle 5: Marcadores moleculares de 66 kDa y 45 kDa. Gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250.

La corrida se realizó como se describe en 2.1 de Materiales y Métodos.

| Paso | Proteínas (mg) | Total (U) | Específica (U/mg) | Rendimiento % | Purificación (veces) |
|-------------------|----------------|-----------|-------------------|---------------|----------------------|
| Extracto sin cel. | 135.5 | 6.875 | 0.051 | 100 | 1 |
| Con-A Sefarosa | 0.725 | 10.725 | 14.79 | 156 | 290 |
| Mono Q Grupo 1 | 0.052 | 5.325 | 102.4 | 78 | 2008 |

Cuadro 1. Purificación de la carboxipeptidasa de *Trypanosoma cruzi*.

La enzima fue purificada a partir de 5 g (peso húmedo) de epimastigotes de la cepa Tul 2. La determinación de actividad enzimática a pH 5.1 y el dosaje de proteínas se realizaron como se describe en 2.2 y 2.3 de Materiales y Métodos, respectivamente (U = μ moles / min).

La actividad total en el eluido de Con-A Sefarosa es mayor que en el extracto crudo. La causa de esto es que al pH de reacción, las proteínas del extracto precipitan, perdiendo parte de la actividad de la enzima. Por esta razón, tanto el rendimiento como la purificación dan valores demasiado elevados. No puede descartarse asimismo la pérdida de un inhibidor de la enzima en el paso de purificación de afinidad, logrando un aumento de su actividad. La actividad específica del grupo 1 (102.4 U/mg) muestra que realmente logramos un gran enriquecimiento en la enzima de interés.

Como alternativas para la purificación, se intentaron cambios en el pH en que se realiza la Mono Q, uso de una Mono P, uso preparativo de una Superdex 75 y utilización de una columna de afinidad para la cisteína proteinasa como paso final (cistatín sefarosa). Ninguno de estos intentos dio resultados positivos, quizás por un problema de condiciones.

La columna de interacción hidrofóbica resultó un buen método alternativo para una purificación total de la cruzipain madura y su dominio C-terminal, que eluyen a 0% de

sulfato de amonio (datos no mostrados), pero no resultó en una mayor purificación de la carboxipeptidasa.

En el caso de la filtración molecular en gel, si bien parece existir una fracción donde la carboxipeptidasa está pura, cuando varias fracciones provenientes de distintas corridas en Superdex 75 realizadas en iguales condiciones (1.5 Materiales y Métodos) se unieron y concentraron para lograr masa, reapareció la contaminación de cruzipaína en geles teñidos por nitrato de plata (no mostrado).

2. Caracterización parcial de la enzima

2.1 Peso molecular aparente de subunidad por SDS-PAGE

Con la enzima parcialmente purificada del grupo 1 se determinó su peso molecular aparente en gel de SDS-PAGE reductor. La movilidad electroforética es una función lineal del logaritmo de su peso molecular. Tomando proteínas de peso molecular conocido, y calculando sus movilidades con respecto al inicio del gel separador, es posible obtener un gráfico como el de la **Figura 10**.

La movilidad electroforética de la enzima resultó de 1.2 cm, lo que equivale a un peso molecular aparente de 63 kDa, como se muestra en la siguiente página.

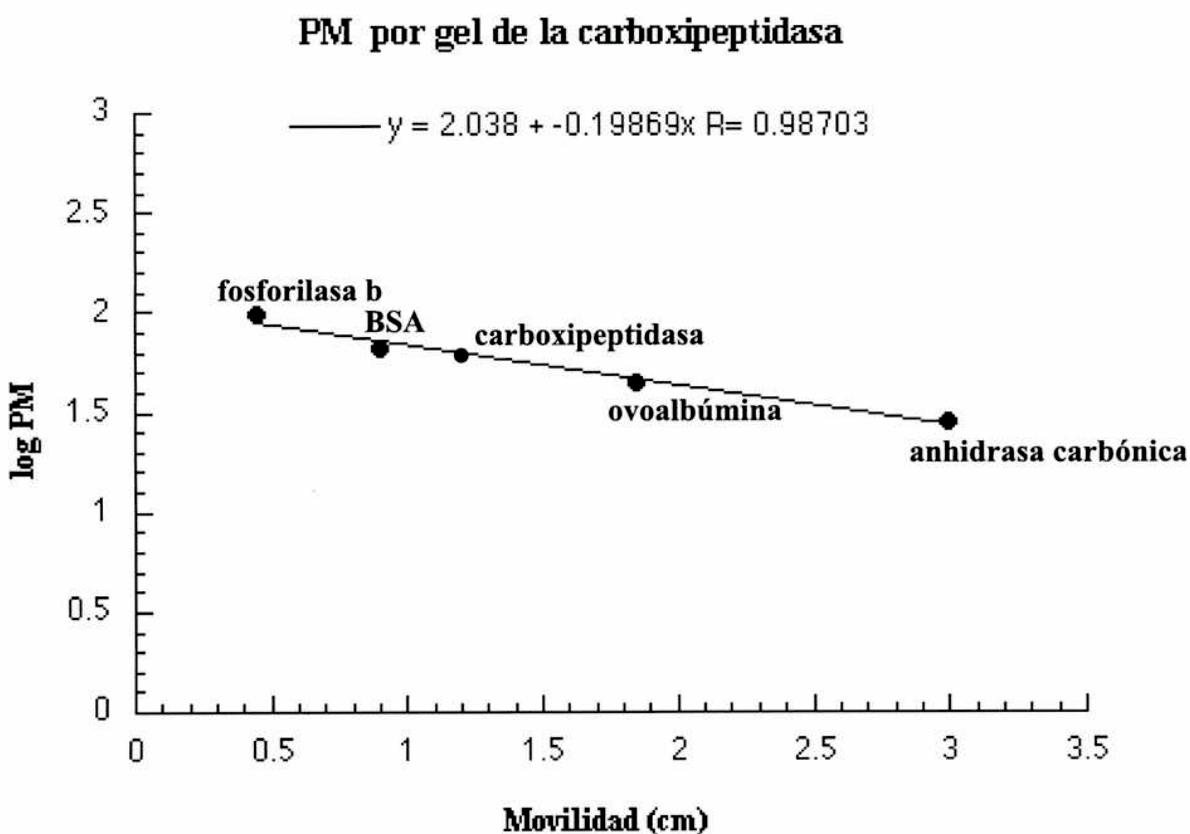


Figura 10. Determinación del peso molecular aparente subunidad por SDS-PAGE.

Se hallan graficados los valores de movilidad electroforética de las proteínas que se indican en función del logaritmo de sus pesos moleculares.

Las condiciones de corrida, así como la obtención de los datos de movilidad, se hallan descriptos en 3.1 de Materiales y Métodos.

2.2 Presencia de puentes disulfuro

La presencia de puentes disulfuro fue evaluada en minigeles de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (**Figura 11**). Los mismos arrojaron el resultado de que existirían puentes disulfuro ya que se observa el patrón curvado correspondiente a una mayor movilidad electroforética de la enzima no reducida. Sin embargo, el patrón obtenido en condiciones no reductoras sugiere un patrón de doble banda, que en condiciones reductoras resulta a veces más difícil de observar.

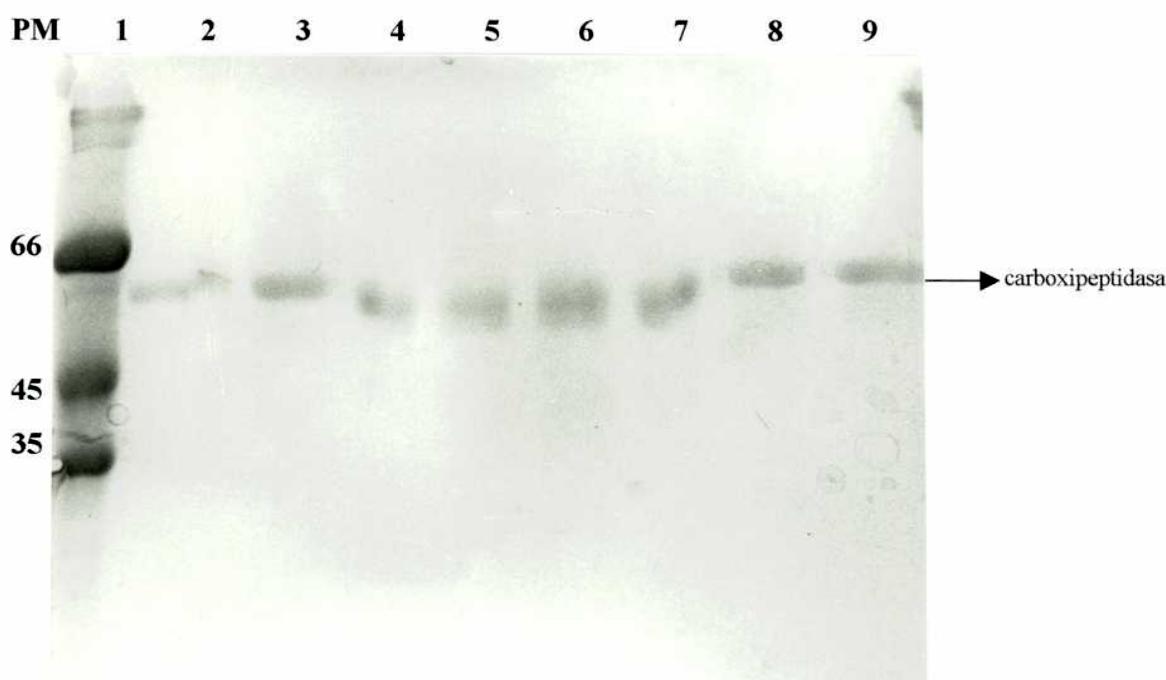


Figura 11. Presencia de puentes disulfuro en gel SDS-PAGE.

Calle 1: Marcadores moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 35 kDa; calle 2,3,8,9: Grupo 1 de fracciones en condiciones reductoras con 10 mM de DTT; calle 4,5,6,7: Grupo 1 de fracciones en condiciones no reductoras. Gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250.

La corrida se realizó como se describe en 3.2 de Materiales y Métodos.

2.3 Glicosilación

El tratamiento de la carboxipeptidasa con endo H indica la presencia de N-glicosilación. Luego del tratamiento de una alícuota del grupo 1 de fracciones con endo H, se observa una disminución de peso molecular aparente de la banda de carboxipeptidasa, en un gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250, indicando la presencia de azúcares (**Figura 13**). Esto se corrobora nuevamente en la tinción específica para azúcares PAS, la cual muestra una banda previamente al tratamiento por endo H, y la desaparición de la misma luego del mismo (**Figura 12**).

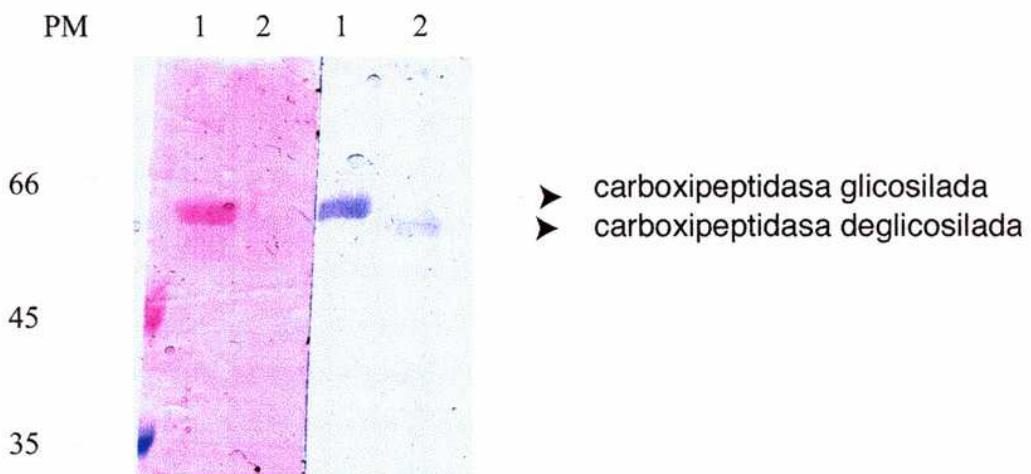


Figura 12 Figura 13

Figura 12. Tratamiento con endo- β -N-acetilglucosaminidasa.

Calle 1: Grupo 1 de fracciones sin endo H; calle 2: Grupo 1 de fracciones con endo H. Gel teñido por PAS.

Figura 13. Tratamiento con endo- β -N-acetilglucosaminidasa.

Calle 1: Grupo 1 de fracciones sin endo H; calle 2: Grupo 1 de fracciones con endo H. Gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250.

El tratamiento y la corrida se realizaron como se describe en 3.3 de Materiales y Métodos.

3. Determinación de la actividad enzimática

3.1 Especificidad de sustrato

La actividad fue ensayada frente a distintos sustratos para el grupo 1 de fracciones. Para caracterizar la actividad de la enzima como carboxipeptidasa se utilizaron (N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Phe-Phe (FA-Phe-Phe) y N-(3-[2-Furyl]Acryloyl)-Ala-Lys (FA-Ala-Lys). La actividad de esterasa fue ensayada con (N-Acetyl-L-Fenilalanina Etil Éster (APEE) y N-Acetyl-L-Tirosina Etil Éster (ATEE)).

Se observó actividad sólo frente a FA-Phe-Phe, mostrando una preferencia por sustratos hidrofóbicos en las condiciones probadas. No se observó actividad sobre FA-Ala-

Lys a pH 5 ó 7,44. No presentó actividad esterasa que se registra en otras carboxipeptidasas descriptas en la literatura (1).

El ensayo sobre gelatina en geles revela la presencia de actividad (**Figura 14a**). Sin embargo, la actividad sobre los mismos se debe a una cisteína proteinasa ya que geles incubados con 50 μ M de E-64 (**Figura 14b**) muestran la desaparición de dicha actividad, mientras que 1 mM PMSF (**Figura 14c**) o 5 mM o-fenantrolina (no mostrado), no la afectan. Se observa un patrón de triple banda. La doble banda superior (de peso molecular aparente menor a 66 kDa) coincide con el patrón que revela la carboxipeptidasa en geles teñidos con Coomasie Brilliant Blue R-250. La banda inferior corresponde a la cruzipain. El dominio C-terminal aislado no es activo.

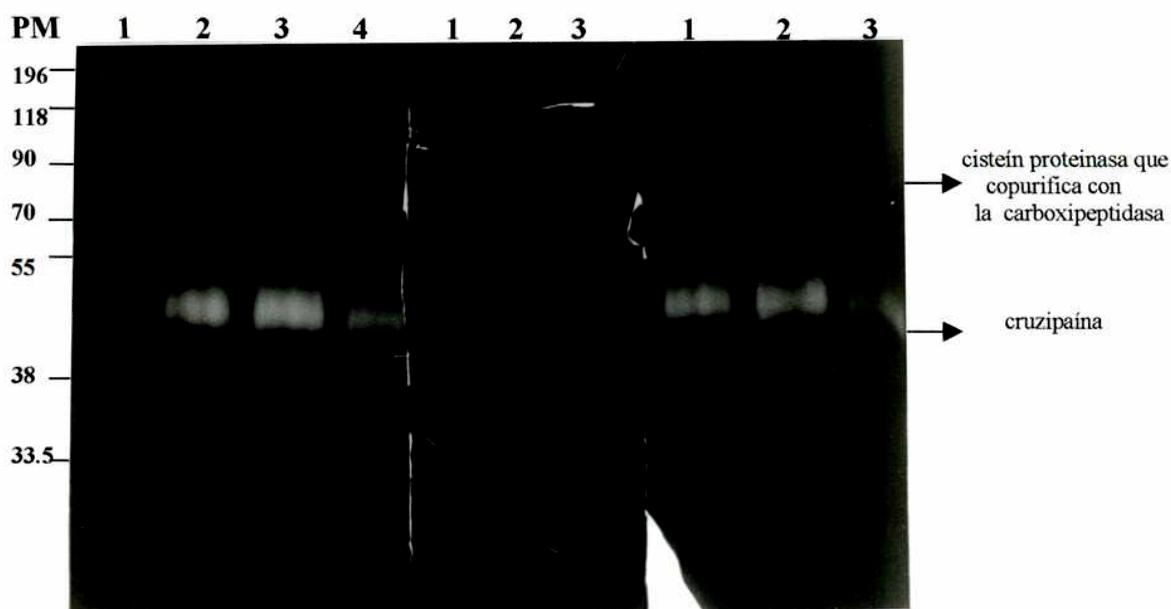


Figura 14a. Actividad sobre gelatina: control sin inhibidor.

Calle 1: Marcadores preteñidos de 196 kDa (α -macroglobulina), 118 kDa (β -galactosidasa), 90 kDa (Fructosa-6-p-quinasa), 70 kDa (Piruvato quinasa), 55 kDa (Fumarasa), 38 kDa (Deshidrogenasa láctica) y 33.5 Kda (Triosa fosfato); Calle 2: Grupo 1 de fracciones; calle 3: Grupo 2 de fracciones; calle 4: Grupo 3 de fracciones de la MONO Q.

Figura 14b. Actividad sobre gelatina: incubado con 50 μ M de E-64.

Figura 14c. Actividad sobre gelatina: incubado con 1 mM de PMSF.

Para 14b y c, calle 1: Grupo 1 de fracciones; calle 2: Grupo 2 de fracciones; calle 3: Grupo 3 de fracciones de la MONO Q. Geles teñidos por Coomasie Brilliant Blue R-250 luego de la incubación.

El tratamiento y la corrida se realizaron como se describe en 4.1 de Materiales y Métodos.

3.2 Caracterización de la actividad en función del pH

Utilizando el sustrato para el cual muestra actividad, FA-Phe-Phe, se realizó una caracterización de la actividad de la enzima a distintos valores de pH. Según muestra la **Figura 15**, la enzima presenta una actividad óptima alrededor de un pH de 5,1.

Para descartar una interferencia del Tris en la actividad, luego de haber ubicado en 5 el pH óptimo de reacción, se utilizó un buffer Tris/Acetato 50 mM a ese pH y no se observó interferencia alguna. Esto descarta que la disminución de la actividad en un buffer de Tris/HCl 50 mM, pH 6,8 se deba a sus componentes. Sin embargo, como el valor real de pH en este medio resulta de 8.32 por no ser un buen buffer en estas condiciones, se ensayó con Tris/Acetato 50 mM, pH 7,44 que mantiene ese valor de pH, observándose la misma pérdida de actividad.

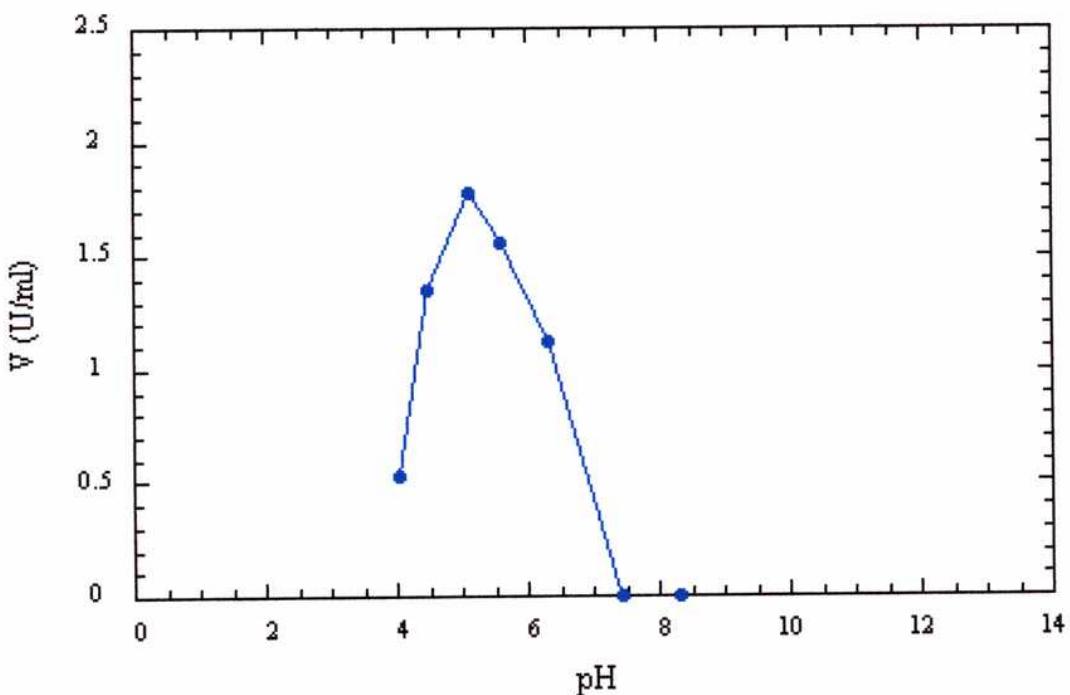


Figura 15. Efecto del pH sobre la actividad de carboxipeptidasa sobre FA-Phe-Phe.
Se hallan graficados los valores de actividad sobre FA-Phe-Phe en función del pH del medio de reacción.
Las condiciones de reacción se hallan descriptas en 4. 2 de Materiales y Métodos.

3.3 Patrón de inhibición

Se estudió el efecto de distintos inhibidores sobre la actividad de la carboxipeptidasa con FA-Phe-Phe. Como muestra el Cuadro 2, p-CMB inhibe un 100%, el HgCl₂ y el 3,4-DCI inhiben alrededor de un 90% mientras el PMSF 1 mM inhibe sólo alrededor de un 40% la actividad sobre FA-Phe-Phe a tiempos cortos, y la inhibición es mayor a tiempos mayores. El resto de los inhibidores no afecta la actividad con respecto a un control sin inhibidor. Los solventes donde se preparan los inhibidores no afectan la actividad de la enzima y la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente no disminuye la actividad enzimática.

| Inhibidores | Serín proteasa | Cisteín proteasa | Metalo proteasa | Aspartil proteasa | Porcentaje de inhibición |
|--------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------|
| E-64 (5 y 50μM) | | X | | | 0% |
| TPCK (0,1 mM) | X | X | | | 0% |
| TLCK (0,1 mM) | X | X | | | 0% |
| HgCl ₂ (3 mM) | | X | | | 93% |
| p-CMB (0,1 mM) | | X | | | 100% |
| PMSF (1 mM) 5 min | X | | | | 40% |
| PMSF (1 mM) 15 min | X | | | | 80% |
| 3,4-DCI (0,1 mM) | X | | | | 90% |
| o-fenantrolina (5 mM) | | | X | | 0% |
| pepstatina (0,1 mM) | | | | X | 0% |

Cuadro 2. Efecto de inhibidores sobre la actividad de carboxipeptidasa con FA-Phe-Phe.

El cuadro muestra el porcentaje de inhibición en la actividad con el agregado de inhibidores comparado a un control sin inhibidor de 1,1 U / ml. Las condiciones de inhibición y de medición de actividad se realizaron como se describe en 4.3 de Materiales y Métodos. Para el PMSF se usaron tiempos de incubación de 5 minutos y 15 minutos.

4. Estudios cinéticos

4.1 Parámetros cinéticos

Se determinaron los valores de Km, Kcat y Vmax para el sustrato FA-Phe-Phe (**Figura 16**). Los mismos arrojaron valores de Km=23 μM , Vmax=1,47 U/ml y Kcat=88.85 s^{-1} .

$$y = 0.68127 + 0.01604x \quad R = 0.99853$$

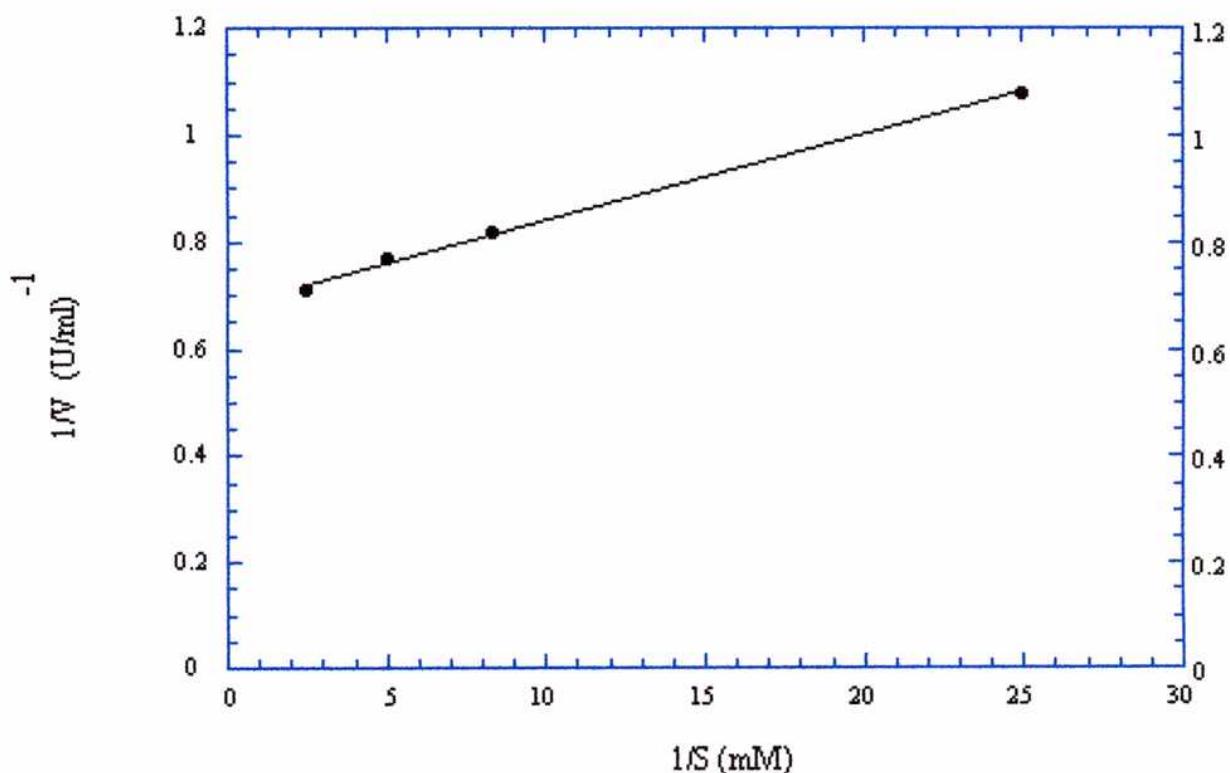


Figura 16. Parámetros cinéticos para la carboxipeptidasa sobre FA-Phe-Phe.

Los valores se determinaron para concentraciones de sustrato de 0.04 mM, 0.12 mM, 0.2 mM y 0.4 mM. Las mediciones se hicieron como se explica en 5.1 de Materiales y Métodos.

5. Localización subcelular

Ensayos con digitonina y la medición de la actividad en las distintas fracciones (**Figura 17b**) sugieren una localización lisosomal de la enzima, que sigue un patrón similar al del marcador lisosomal cruzipain, dentro de los errores experimentales.

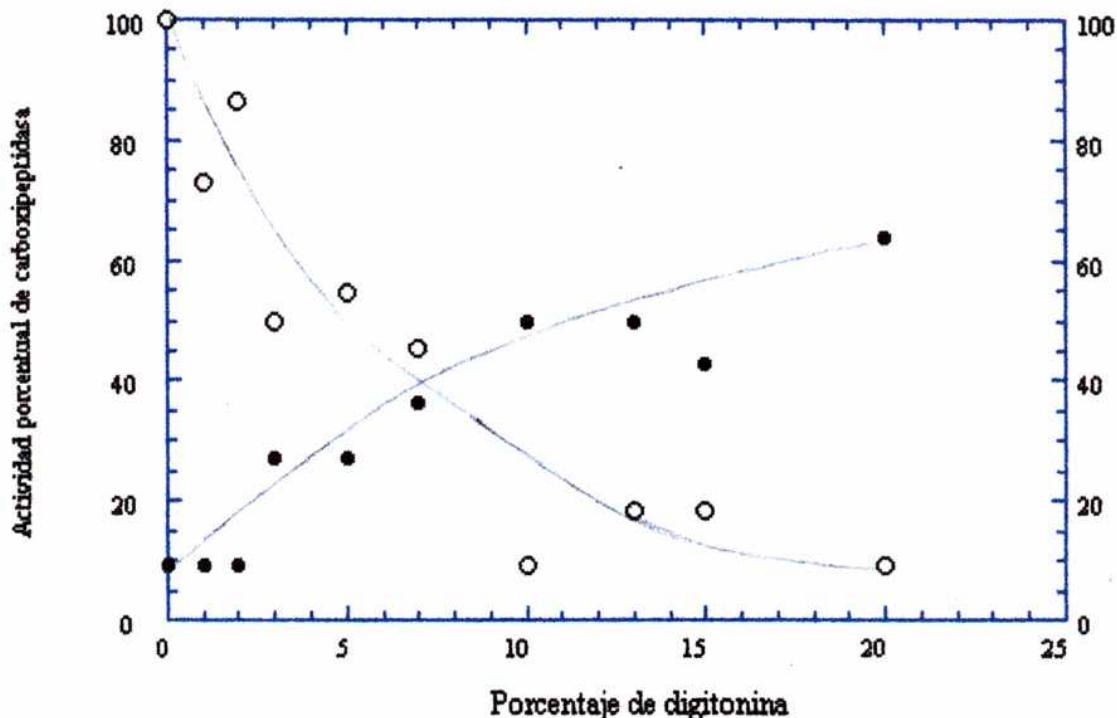


Figura 17a Actividad porcentual de la carboxipeptidasa en sobrenadante y precipitado resultante del tratamiento con digitonina.

○: precipitado ; ●: sobrenadante

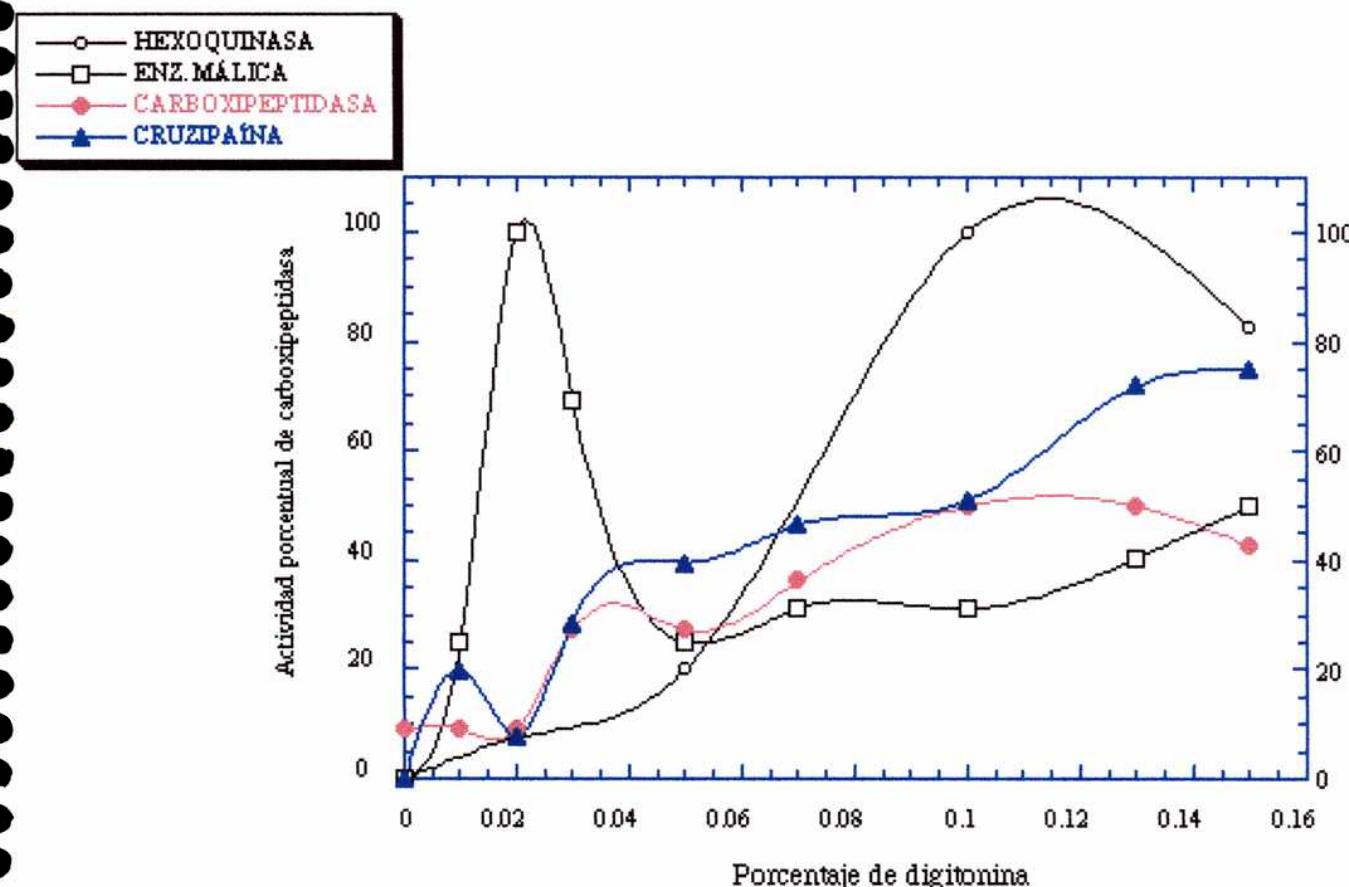


Figura 17b. Localización subcelular de la carboxipeptidasa comparada con las curvas de enzimas marcadoras de distintas localizaciones subcelulares.

Las mediciones se hicieron como se explica en 6 de Materiales y Métodos.

6. Secuenciación

Luego de preparar un extracto libre de células y pasar la muestra por una Con-A Sefarosa, se realizó una columna Mono Q como se detalla en 1.3 Materiales y Métodos, pero con un flujo de 1ml/min, fracciones de 1 ml, 50 ml de volumen total y en un aparato de FPLC™ de Pharmacia, Biotech. Se hacen de esta corrida dos grupos de fracciones basándose en los picos principales de absorbancia a 280 nm y la medición de actividad de cruzipain (2.2.2 Materiales y Métodos). El primer grupo de fracciones

presentaba el patrón de triple banda típico de la cruzipain, más otras bandas minoritarias y una actividad baja de cruzipain. El segundo grupo presentaba la banda inferior de la doble y el C-terminal, con mucha actividad de cruzipain.

La secuenciación proteica arrojó el resultado que de las tres bandas características de la cruzipain, la banda superior (aproximadamente 63 kDa) se encuentra bloqueada en el extremo N-terminal. La segunda banda desde arriba (aproximadamente 45 kDa) respondió en 10 ciclos a la cruzipain, en la secuencia N-terminal del dominio catalítico (APAAVDWRAR) excepto por el triptofano que no pudo ser visto (**Figura 18**).

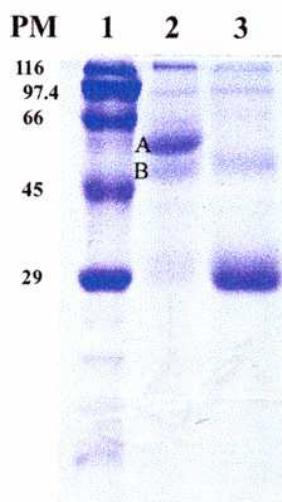


Figura 18. Fracciones secuenciadas por su extremo N-terminal.

Calle 1: Marcadores moleculares de 205 kDa, 116 kDa, 97,4 kDa, 66 kDa, 45 kDa y 29 kDa; calle 2: Primer grupo de fracciones; calle 3: Segundo grupo de fracciones. Gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250. Se señalan las bandas que se secuenciaron (A, B). A: proteínas con bloqueo N-terminal; B: secuencia N-terminal del dominio catalítico de la cruzipain (APAAVDWRAR), excepto por W.

El tratamiento de las muestras se detallan en 7.1 de Materiales y Métodos.

Para lograr una secuencia o identidad parcial de la banda bloqueada, se realizó una secuenciación de péptidos provenientes de digestión tríptica. También se confirmó de esta manera la identidad de la banda secuenciada por su extremo N-terminal.

Luego de preparar un extracto libre de células y pasar la muestra por una Con-A Sefarosa, se realiza una columna Mono Q como se detalla en 1.3 Materiales y Métodos, pero con un flujo de 1 ml/min, fracciones de 1 ml, 100 ml de volumen total y en un aparato de FPLCTM de Pharmacia, Biotech, para tratar de resolver mejor la triple banda por separado. Se hacen de esta corrida tres grupos de fracciones basándose en los picos principales de absorbancia a 280 nm, la medición de actividad de cruzipain -como se indica anteriormente- y geles con las fracciones. El primer grupo de fracciones presentaba el patrón de doble banda entre los marcadores de 66 y 45 kDa (**Figura 19**), más otras bandas minoritarias y una actividad baja de cruzipain. El segundo grupo presentaba la banda por sobre el marcador de 45 kDa y una de bajo PM aparente (aproximadamente 25 kDa) que podría corresponder al C-terminal; este grupo presentaba actividad de cruzipain elevada. El último grupo, presentaba las mismas dos bandas, más otras minoritarias y la mayor actividad de cruzipain.

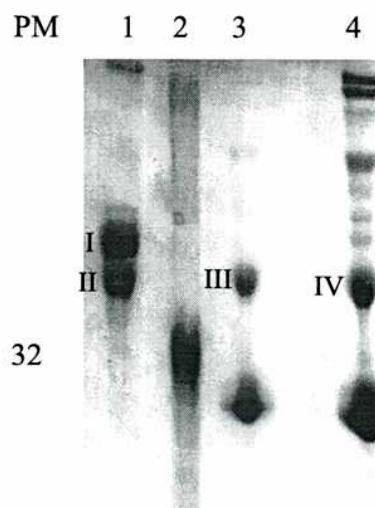


Figura 19. Fracciones utilizadas para digestión tríptica.

Calle 1: Primer grupo de fracciones; calle 2: Marcador preteñido de 32 kDa; calle 3: Segundo grupo de fracciones; calle 4: Tercer grupo de fracciones. Gel teñido por Coomasie Brilliant Blue R-250. Las bandas analizadas se indican de I a IV.

El tratamiento de las muestras se detallan en 7.2 de Materiales y Métodos.

La digestión en gel de I, la banda que se encuentra bloqueada en el extremo N-terminal, dio una mezcla de péptidos que no indicó identidad con proteínas conocidas por MALDI-TOF. Se cromatógrafió entonces la mezcla por HPLC en fase reversa para separar péptidos. MALDI-TOF de picos supuestamente homogéneos tampoco dio homología con péptidos disponibles en bases de datos. Frente a este hecho, se secuenciaron por degradación de Edman algunos de los péptidos provenientes de digestión tríptica (**Figura 20**).

El patrón de masas de los péptidos de la banda II de la **Figura 19**, confirmó por MALDI-TOF la presencia de la cruzipain. Los péptidos en los digeridos de las bandas III y IV dieron patrones de masas de MALDI-TOF similares a II.

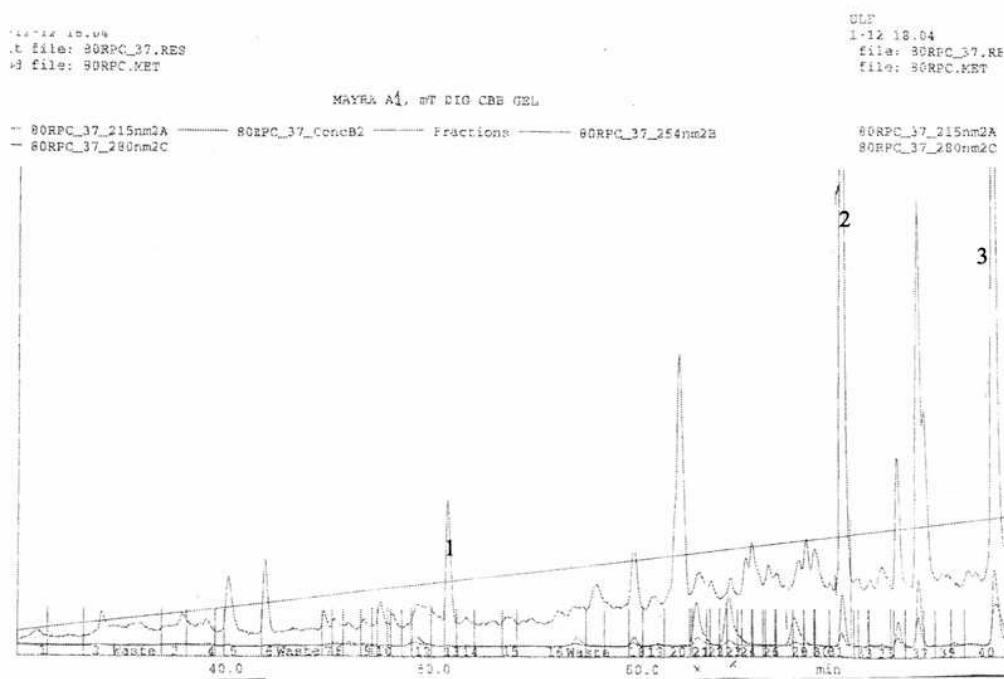


Figura 20. Purificación por HPLC de péptidos obtenidos por digestión *in gel* con tripsina de la banda A en las condiciones especificadas en 7.2 de Materiales y Métodos. Los péptidos marcados 1, 2 y 3 dieron las secuencias mostradas en el texto. La línea de lectura más alta corresponde a ABS_{215 nm}, la más baja a ABS_{280 nm}.

Los péptidos secuenciados fueron:

- 1) **EDVQSSLGAK**
- 2) **LFVVGESYGGHYAPATAHYINK**
- 3) **EGDKHYFYWAFGPR**

El péptido **2** arrojó identidad con carboxipeptidasas serínicas, más precisamente un péptido dio homología con [P52711] CP23 HORVU (CPX; 2-3) Serine Carboxypeptidase II-3 PRECURSOR. Esta es una carboxipeptidasa tipo C y tiene 516 aminoácidos. También dio homología con CBPX ARATH (539 aminoácidos) y CPB3 (500 aminoácidos). Este péptido presenta la serina del sitio activo, marcada en color.

El péptido **3** dio homología con [U67174] 014414 CPY Carboxypeptidase Y de *Pichia augusta*, 537 aminoácidos. También mostró homología con CPBY PICPA, Carboxypeptidase Y Precursor de *P. pastoris* (523 aminoácidos) y con CBPY YEAST, Carboxypeptidase Y Precursor de *S. cerevisiae* (532 aminoácidos) en menor valor.

El péptido **1** no dio homología aminoacídica con las secuencias presentes en el BLAST X.

Es interesante notar que las proteínas mencionadas tienen valores de PM similares al determinado para la enzima en estudio, con las incertidumbres lógicas por tratarse de glicoproteínas.

7. Western blots

Western blots realizados con anticuerpos contra la cruzipain (no mostrados) y contra el dominio C-terminal de la misma (**Figura 21**), disponibles en el laboratorio y supuestamente específicos para la cruzipain, mostraron reacción positiva en las bandas A y B de la **Figura 18 o I y II de la Figura 19 (Figura 21)**.

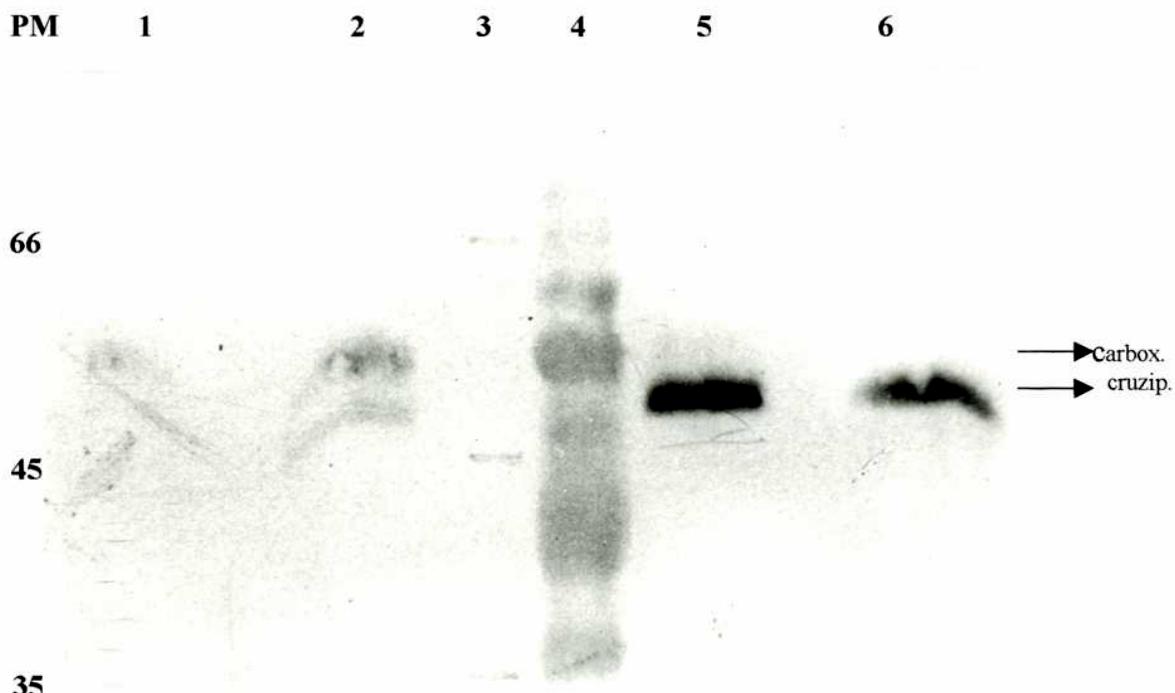


Figura 21. Western blots con anticuerpos contra dominio C-terminal del laboratorio (dilución 1/1000).

Calle 1: Grupo 1 de fracciones de Mono Q; calle 2: Grupo 2 de fracciones de Mono Q; calle 3: Marcadores moleculares de 66 kDa, 45 kDa y 35 kDa; calle 4: Marcadores preteñidos de 196 kDa (α -macroglobulina), 118 kDa (β -galactosidasa), 90 kDa (Fructosa-6-p-quinasa), 70 kDa (Piruvato quinasa), 55 kDa (Fumarasa), 38 kDa (Deshidrogenasa láctica) y 33.5 Kda (Triosa fosfato); calle 5: Grupo 3 de fracciones de Mono Q; calle 6: cruzipaína purificada con un paso extra de columna hidrofóbica.

Las corrida electroforética, electrotransferencia y western blot se realizaron como se describe en 9 de Materiales y Métodos.

Para evaluar la especificidad del suero anti-cruzipaína que se obtenía de una preparación de Con-A Sefarosa, utilizando las bandas recortadas de gel se obtuvieron anticuerpos contra la cruzipaína madura (banda B de **Figura 18** o II de **Figura 19**) y nuevamente contra su dominio C-terminal aislado, como se detalla en 8 de Materiales y Métodos. Se suponía que el anticuerpo anti-C-terminal ya disponible debería ser específico de la cruzipaína, pues es difícil que ambas enzimas posean una banda de aproximadamente 25 kDa que también compartan, si éste había sido hecho sólo contra ese dominio. Sin embargo, se quisieron corroborar los sueros disponibles en el laboratorio.

Un primer intento se realizó con una dilución 1/500 de los sueros obtenidos de los ratones y 0.23 µg de cada muestra usada en la **Figura 21**. No se obtuvo señal alguna.

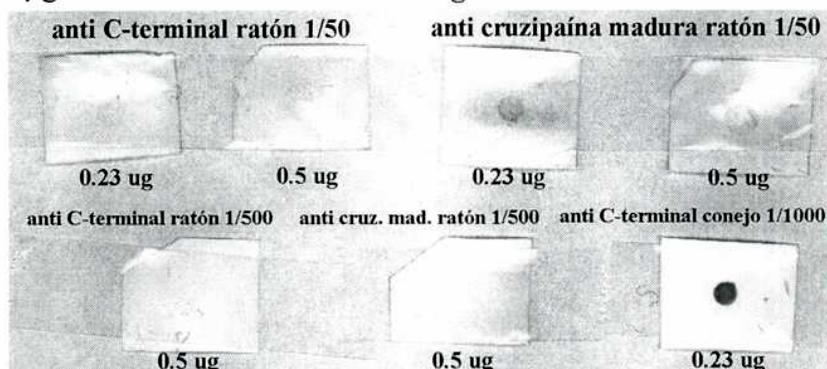


Figura 22. Dot blots con anticuerpos contra cruzipaína madura y contra su dominio C-terminal en distintas diluciones y para distintas concentraciones proteicas. La muestra sembrada fue la cruzipaína proveniente de la Mono Q (fracción 3).

Los dot blots se realizaron como se describe en 10 de Materiales y Métodos.

Como se supuso que era una dilución suficientemente baja del suero como para obtener un resultado, se realizaron los dot blots de la **Figura 22** para determinar si la falla estuvo en la cantidad de proteína sembrada, la dilución del suero o la dilución del suero contra ratón empleada.

El análisis de los blots revela que ni la cantidad de 0.23 µg de proteína sembrada, ni la dilución de los sueros contra ratón (1/2500) fue la causa de no obtener resultado en el

Western blot, pero si lo fue la dilución usada de los sueros de ratón. Se necesitaría usar una dilución 10 veces menor para obtener señales suaves.

A su vez, el resultado obtenido en los dot blots muestra que el suero contra cruzipaína madura resultó, a igual dilución de 1/50, más sensible que el suero contra el dominio C-terminal de la enzima.

El anticuerpo anti C-terminal de conejo se usó como control de que el revelado anduviera bien y la cantidad de proteína usada en el Western original no fuera insuficiente aún para un buen anticuerpo con el cual ya se había obtenido señal en la **Figura 21**.

Se reincubaron entonces los filtros disponibles del Western blot con una mayor concentración de los sueros obtenidos de ratón (1/50), durante toda una noche. No se obtuvo sin embargo señal alguna.

Discusión

Debido a encontrarse bloqueada en su extremo N-terminal, la presencia de una carboxipeptidasa quedó enmascarada hasta realizar una secuenciación de péptidos provenientes de una digestión tríptica de las bandas por separado. Anteriores purificaciones de la cruzipain incluían a la carboxipeptidasa pues en la Mono Q se usaba condiciones en las cuales copurificaban. Aún cuando se habían realizado anteriormente gradientes más planos, esta enzima no había sido encontrada pues la fracción de mayor actividad de la cruzipain se encuentra al final del gradiente, por lo cual las fracciones iniciales se descartaban por baja actividad de la enzima que era anteriormente la de interés.

La presencia de azúcares visualizada luego del tratamiento por endo H y tinción de PAS era esperable debido a que el primer paso de purificación corresponde a una afinidad para azúcares. Estudios preliminares indicarían la presencia de Manosa 9 y posiblemente Manosa 8 y 7.

Los datos bioquímicos (PM, puentes disulfuro, sustrato utilizado, etc.) obtenidos coinciden con los disponibles en la literatura (30 - 33) para las carboxipeptidasas C.

La inhibición parcial por PMSF, inhibidor de la gran mayoría de las serín proteinasas, no indica que no se trate de una enzima de esta clase, pues no todas las proteasas de una misma clase son necesariamente inhibibles con igual intensidad por un inhibidor determinado. Además, también se ha informado una inhibición más lenta por PMSF comparado con otros inhibidores, lo cual observamos al notar mayor inhibición con tiempos de incubación mayores (31). Quizás se requieran mayores tiempos aún para una inhibición completa. Otro inhibidor característico para las enzimas de esta clase, es el 3,4-DCI que sí resultó ser un buen inhibidor de la carboxipeptidasa.

La inhibición por cloruro de mercurio y p-CMB sugiere un papel importante de sulfidrilos libres. Por otro lado, concuerda con lo informado en la literatura (31, 32, 46) para otras enzimas pertenecientes a la misma familia.

La ausencia de inhibición por o-fenantrolina, que indica la falta de requerimiento de cationes divalentes y descarta la posibilidad de que se trate de una metaloproteasa, también ha sido informado para este tipo de enzimas (31, 32). Más aún, el EDTA es parte del medio de reacción, lo que indica la necesidad de quitar los cationes divalentes para permitir la actividad.

El patrón doble de bandas que se visualiza mejor en el gel con muestras no reducidas que reducidas (**Figura 12**), podría indicar la presencia de dos proteínas de igual peso molecular pero distinto número de puentes disulfuro.

La ausencia de actividad esterasa es una diferencia llamativa. Sin embargo, sólo se probaron dos de los muchos sustratos que pueden usarse; por lo cual, quizás no se encontró la actividad por no usar el sustrato o las condiciones adecuadas.

El valor obtenido de K_m para FA-Phe-Phe resulta razonable para sustratos sintéticos de peptidasas.

En geles con gelatina, se esperaba que no exista actividad al tratarse de una exopeptidasa. Sin embargo, esto permitió discriminar si la actividad observada en dichos geles en trabajos previos realizados en el laboratorio pertenecía a la cruzipain exclusivamente.

El hecho que en geles de gelatina, una técnica muy sensible, se vea una doble banda donde estaría la carboxipeptidasa, y una banda más a la altura de la cruzipain madura, y siendo éstas inhibibles por E-64, sugiere que podría haber por lo menos trazas de una cisteína proteinasa, además de la carboxipeptidasa que se revela por la actividad sobre FA-Phe-Phe no inhibible por E-64. Esto podría confundir y hacer pensar que la doble banda sería parte también de la cruzipain y ésta podría presentar una actividad carboxipeptidasa no inhibible por E-64. Sin embargo esto no es posible pues la secuenciación de péptidos mostró claramente la presencia mayoritaria de serin carboxipeptidasa tipo C sin revelar

péptidos para cruzipaína. La ausencia de péptidos para esta última proteinasa, pero la presencia de actividad de una cisteín endoproteasa, podría sugerir que hay otra enzima de esta clase o algún polimorfismo de los muchos que presenta la cruzipaína, pero que en masa son despreciables y por eso no se las identifica en la secuenciación. Otra de las razones podría ser que no se haya secuenciado la suficiente cantidad de péptidos para hallar otra enzima. Además, deberían secuenciarse cada una de las proteínas de la doble banda a la altura de la carboxipeptidasa por separado, lo cual se encuentra en proceso para determinar si se trata de una o más cisteín proteinasas. Una de las bandas creemos puede corresponder a la proforma incompleta de la cruzipaína, idea que originó todo el trabajo.

Se utilizaron anticuerpos anti-C-terminal pues resulta más confiable que el suero contra cruzipaína total que se disponía hasta el momento, ya que el último estaba hecho de muestras purificadas por métodos que incluyen a la cromatografía de afinidad, donde copurifican la carboxipeptidasa y la cruzipaína. En el dominio C-terminal resulta más improbable que se halle un péptido que pertenezca a ambas enzimas o de reacción cruzada nuevamente.

El uso de estos anticuerpos anti-dominio C-terminal también muestra como los geles de gelatina trazas de una proteína reconocida por él, aún en las fracciones que parecían más homogéneas por tinción. Esto puede interpretarse como la posible presencia de una cisteín proteinasa relacionada con la cruzipaína, o de una proteína que presente reacción cruzada por los hidratos de carbono que posee. El intento dilucidar esta cuestión a través de la obtención de sueros anti-C-terminal y anti-cruzipaína madura, empleando el material libre de carboxipeptidasa obtenida por HIC (pg. 40 de Resultados), no fue fructífero pues los sueros obtenidos presentaron títulos muy bajos.

La localización lisosomal sugerida por los experimentos de permeabilización con digitonina es compatible con el valor de pH óptimo ácido determinado.

No se sabe aún sin embargo, si la localización es exclusivamente lisosomal o puede tener otras, pues la actividad del sobrenadante de mayor concentración de digitonina no iguala la actividad en el precipitado a concentración cero. Esto podría deberse a errores experimentales en las últimas fracciones del sobrenadante que afectaran la actividad de la enzima, o a inhibición progresiva de la carboxipeptidasa por digitonina como se ha observado en otras enzimas.

A partir de los péptidos que arrojaron identidad de carboxipeptidasa y secuencias disponibles en las bases de datos, la Lic. F. Parussini diseñó oligonucleótidos para la amplificación del gen por PCR a partir de DNA genómico de *T. cruzi*, cepa *CL-Brener*. Los oligonucléotidos diseñados fueron:

- car1 (ggYTgRTccATIggMAccATRTgIcc)
- car2 (gARggIgAYAAgCAYTAcTTYTAcTgg) y
- Tbcar (ggYTgRTccATIggMAccATRTgIcc).

Con ellos se obtuvieron fragmentos que se solapan de 800 (car1 y Tbcar) y 1200 (car2 y Tbcar) pares de bases por PCR sobre DNA genómico de *CL-Brener*. La secuencia parcial obtenida (**Figura 23**) indica una alta homología con [P32826] CPBX ARATH, Serine Carboxypeptidase precursor (*A. thaliana*), 539 aminoácidos. Son proteínas Carboxypeptidase Y like. Esta secuencia no posee aún 300 bases del extremo carboxilo y 186 bases del extremo amino, según se considera por comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos.

Una vez obtenida esta secuencia, se pudieron localizar todos los péptidos secuenciados, aún los que no presentaron homología en la base de datos, con pequeñas modificaciones (**Figura 23**). También se indican los sitios de corte con tripsina.

EGDKHYFYWAFGPRNGNPEAPVLLWMTGGPGCSSMFALLAENGPCLVNETTGDIYKN
PÉPTIDO 3
NYSWNNEAYVIYVDQPAGVGFSYAEVEDYDSNEEVSEDMYHFLQAFFRAHQKLRKN

KLFVVGESXGGHYAPATAHXINKANREHVGLPIRLAGLAGVGNGLDPXTQYAAYPSX
PÉPTIDO 2
AWGWCREKLGEPCVSEEGYQQMSSMVXPCQKAIEICNSDNNFIAKXACVTARVLCNPII
GVYSATGLNNYDIRKPCIGTLCYNFDALNAFMNREDVQSSLGAKRQVWQSCNMEVNL
PÉPTIDO 1
MFLMDWFKNFNYTVPTLLEDGVSVMIYAGEMDFICNWIGNKQWTTALNWPPGKAVFNA
APDEPFRAPDGTVAGLXRHPXRRRRRT.PSCRCTTRATWXPPIN

Figura 23. Secuencia parcial de la carboxipeptidasa de *T. cruzi*, cepa *CL-Brener*, obtenida por PCR, traducida a aminoácidos. Comienza en el aminoácido 92, según la numeración de otras carboxipeptidasas de la familia S10.

Las secuencias correspondientes a los péptidos 1, 2 y 3 se encuentran en color; los sitios de corte con tripsina están subrayados.

Todas estas secuencias son preliminares, y necesitan ser comprobadas nuevamente.

Por otro lado, una búsqueda realizada sobre una librería de cósmidos de *T. cruzi* cepa *CL-Brener* que representa 25 genomas, usando como sondas los fragmentos de 800 y 1200 pares de bases que se lograron por PCR, dio 57 clones positivos. Esto indicaría que se trataría de un gen de copia única o a lo sumo de dos copias. Sin embargo, esto aún debe ser evaluado ya que el polimorfismo a nivel de nucleótidos en la tercera base de los codones en general, y la abundancia con que se encuentra en las librerías de GSs, ponen aún en duda cuál es su número en el genoma.

Futuros proyectos del laboratorio tenderán a completar la caracterización de la carboxipeptidasa, incluyendo la composición en azúcares de las cadenas de oligosacárido, la finalización de su secuencia y análisis de la abundancia relativa de la enzima en el genoma, e incluirán la comparación de la actividad de la enzima nativa y la recombinante, expresada en *E. coli* o en el sistema de células de insecto (baculovirus).

Conclusiones

- 1) Hemos detectado por primera vez una actividad de serín carboxipeptidasa en el *Trypanosoma cruzi*. Este tipo de enzima no había sido descripto aún en Trypanosomátidos.
- 2) El extremo N-terminal de la carboxipeptidasa se encuentra bloqueado.
- 3) La homología de secuencia tanto por los péptidos secuenciados como por las secuencias parciales nucleotídicas, sugiere que se trata de una serín carboxipeptidasa de tipo C.
- 4) Se trata de una glicoproteína, presumiblemente del tipo alta manosa, con un peso molecular aparente de 63 kDa.
- 5) Presenta puentes disulfuro y además uno o más sulfidrilos libres importantes para la actividad.
- 6) Tiene mayor afinidad por sustratos con residuos hidrofóbicos en P1' a valores de pH ácidos. Esto está de acuerdo con su ubicación lisosomal.
- 7) No hemos detectado actividad de esterasa en las condiciones ensayadas y no presenta actividad gelatinolítica.
- 8) Se inhibe parcialmente con PMSF, inhibidor de la mayoría de las serín proteasas, muestra una inhibición mayor con 3,4-DCI, otro inhibidor de serín proteinasas, y completa con p-CMB y HgCl₂.



Dr. J.J. Carroll



MAYRA GARCÍA

Bibliografía

- (1) WHO. 1991. Technical Report Series Nº 811.
- (2) Abalos, J. W. 1972. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Pg. 347.
- (3) Pinto Díaz, J. C. 1984. Mem. Inst. Osw. Cruz. 79: 85.
- (4) Rosenstein-Campanini, A., Blanco, S., Alvarez, M., de Rissio, A. M., Lansetti, J. C. y Segura, E. 1992. Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Madoery, R., Madoery, C. y Camera MI. Ed. Pg. 237.
- (5) De Rezende, M. J. y Luqueti Ostermayer, A. 1994. Enfermedad de Chagas. Doyma Argentina S.A. Buenos Aires, Argentina. Cap. 20.
- (6) Puigbó, J. J., Giordano, h., Suárez, C., Acquatella, H. Y Combellás, I. 1992. Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Madoery, R., Madoery, C. y Camera MI. Ed. Pg. 27.
- (7) Smuñis, G. A. 1994. La Enfermedad de Chagas y Sistema Nervioso. OPS. Cap. 1.
- (8) Petry, K. and Eisen, H. 1989. Chagas Disease. A model for the study of Autoimmune Diseases. Parasitol. Today. 5: 11 – 116.
- (9) Tarleton, R. L., Zhang, L., Downs, M. O. 1997. “Autoimmune rejection” of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc Natl Acad Sci USA. 94 (8): 3932 – 7.
- (10) Urbina, J. A 1999. Chemotherapy of Chagas’ disease: the how and the why. J Mol. Med. 77 (3): 332 – 8.
- (11) Freilij, H., Altech, J. y Storino, R. 1994. Enfermedad de Chagas. Doyma Argentina S.A. Buenos Aires, Argentina. Cap. 15.
- (12) Ibañez, C. 1989. Tesis de Doctorado: Clonado y caracterización de genes que codifican antígenos de *Trypanosoma cruzi*.
- (13) Affranchino, J. L. 1987. Tesis de Doctorado: Citocromos de *Trypanosoma cruzi*.
- (14) Tomlinsom, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., Nussenzweig, V. 1995. The induction of Trypanosoma cruzi trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology. 110: 547 – 54.
- (15) Opperdorff, F. R. 1988. Glycosomes may provide clues to the import of peroxisomal proteins. TIBS. 13: 255 – 260.
- (16) Cazzulo, J. J. y Segura, E. L. 1985. Trypanosoma cruzi. En: Carcavallo, H.,

- Rabinovich, J. y Tonn, R. J., eds. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo II: 251 – 262.
- (17) Cannata, J. J. B. y Cazzulo, J. J. 1984. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 79B, (3): 297 – 308.
- (18) Sloof, P., Benne, R. 1997. RNA editing in kinetoplastid parasites: what to do with U. Trends Microbiol. 5: 189 – 195.
- (19) Tait, A. and Sacks, D. L. 1988. The cell biology of parasite invasion and survival. Parasitol. Today. 4: 228 – 234.
- (20) Sanchez, D., Affranchino, J. L. and Frash, A. C. C. 1989. Expresión de un antígeno de *T. cruzi* en células superiores. Resúmenes de la XXV Reunión Nacional de SAIB.
- (21) Mc Donald, J. K. 1985. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature and classification. Histochem. 17: 773 – 785.
- (22) Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science. 224: 350 – 357.
- (23) Mc Kerrow, J. H., Sun, E., Rosenthal, P. J. and Bouvier, J. 1993. The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. Annu. Rev. Microbiol. 17: 821 – 853.
- (24) Barrett, A. J. 1994. Methods in Enzymology, Vol 244. Academic Press. San Diego, California, USA. Pg. 1 - 15.
- (25) Cazzulo, J. J. 1991. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*. In: Biochemistry of Parasitic Protozoa. Coombs, G. H. And North, M. J. (eds.). Taylor & Francis Ltd. 17: 191 – 199.
- (26) Martínez, J. and Cazzulo, J. J. 1992. Anomalous electrophoretic behaviour of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* in relation to its apparent molecular mass. FEMS Microbiology Letters. 95: 225 – 230.
- (27) Cazzulo, J. J., Stoka, V. and Turk, V. 1997. Cruzipain, the Major Cysteine Proteinase from the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. Biol. Chem. 378: 1 - 10.
- (28) Labriola, C., Cazzulo, J. J. and Parodi, A. J. 1995. Retention of Glucose Units Added by the UDP-GLC:Glycoprotein Glcosyltransferase Delays Exit of Glycoproteins from Endoplasmic Reticulum. The Journal of Cell Biology. Vol. 130. 4: 771 – 779.
- (29) Podobnik, M., Kuhelj, Turk, V. and Turk, D. 1997. Crystal Structure of the Wild-type Human Procathepsin B at 2.5 Å Resolution Reveals the Native Active Site of a

- Papain-like Cysteine Protease Zymogen. J. Mol. Biol. 271: 774 – 788.
- (30) Barrett, A. J. 1994. Methods in Enzymology, Vol 244. Academic Press. San Diego, California, USA. Pg. 42 - 248.
- (31) Lorand, L. 1976. Methods in Enzymology, Vol 45. Academic Press. San Diego, California, USA. Pg. 561 - 587.
- (32) Hirs, C.H.W., Timasheff, S. N. 1977. Methods in Enzymology, Vol 47. Academic Press. San Diego, California, USA. Pg. 73 - 93.
- (33) Rettig, W. J. 1998. Carboxypeptidase C including carboxypeptidase Y. En Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett, A. J., Rawlings, N. D y Woessner, J. F. (Editors). Academic Press. San Diego, California, USA. Cap. 132: 389 – 393.
- (34) Mortensen, U. H., Olesen, K. y Breddam, K. 1998. Lysosomal carboxypeptidase A. En Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett, A. J., Rawlings, N. D y Woessner, J. F. (Editors). Academic Press. San Diego, California, USA. Cap. 133: 393 - 398.
- (35) Pshezhetzky, A. V.. 1998. Carboxypeptidase D. En Handbook of Proteolytic Enzymes, Barrett, A. J., Rawlings, N. D y Woessner, J. F. (Editors). Academic Press. San Diego, California, USA. Cap. 134: 398 – 401.
- (36) Degan, F. D., et al. 1992. Purification and Characterization of Two Serine Carboxypeptidases from *Aspergillus niger* and Their Use in C-Terminal Sequencing of Proteins and Peptide Synthesis. Applied and Environmental Microbiology, Vol 58, 7: 2144 - 2152.
- (37) Cazzulo, J. J., Franke de Cazzulo, B. M., Ruiz, A. M. and Cannata, J. J. B. 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. Mol. Biol. Parasitol. 16: 329 – 343.
- (38) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 – 685.
- (39) Cazzulo, J. J., et al. 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Acta 1037: 186 – 191.
- (40) Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248 – 254.

- (41) Martinez, J. 1989. Seminario de Licenciatura: La cisteína proteasa principal de *Trypanosoma cruzi*: presencia y niveles en diferentes cepas y formas de desarrollo del parásito.
- (42) Cannata, J. J. B. and Cazzulo, J. J. 1984. Glycosomal and mitochondrial malate deshydrogenases in epimastigotes of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 11: 37 – 49.
- (43) Hellman, U. 1997. Isolation of peptides for microsequencing by in-gel proteolytic digestion. En: Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing (Kamp, R. M., Choli-Papadopoulou, T. and Wittmann-Liebold, B., editors). Springer-Verlag, Heidelberg. Pg. 97 – 104.
- (44) Jensen, O. N., Shevchenko, A. and Mann, M. 1997. Protein analysis by mass spectrometry. En Protein Structure, A practical approach. (Creighton, T. E. ed.). Oxford University Press, NY, USA. Pg.: 29 – 57.
- (45) Heinrich, H. R. 1979. A novel SH-type carboxipeptidase in the inner membrane of rat-liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 96 (1): 9 – 15.