

Proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*

MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES¹, MILAGROS MÉNDEZ², EVA VONASEK²,
PEDRO J. ROMERO¹ Y CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ-CHINEA¹

¹Laboratorio de Fisiología de Membranas, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela y ²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. Centro de Biología Estructural. Unidad de Proteómica. Email: mariac.perez@ciens.ucv.ve

Para la supervivencia y transmisión de las diferentes especies de *Leishmania* dentro de sus células dianas, estas requieren de factores proteicos que interactúen y modifiquen los ambientes intracelulares de dichas células. Durante la última década, varios enfoques se han aplicado al estudio de las proteínas exportadas por organismos parasitarios en etapas particulares de su ciclo de vida. Al conjunto de proteínas exportadas al exterior celular en condiciones definidas se les denomina exoproteoma. Diferentes proteasas en *Leishmania* han sido vinculadas como factores de virulencia. Actualmente, es poca la información existente sobre proteasas presentes en el exoproteoma que pudieran estar asociadas con el proceso de infección y mantenimiento del parásito. Por tal motivo, nuestro objetivo es el de profundizar en la identificación de proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, con el fin de establecer comparaciones entre ambos. Mediante técnicas de espectrometría de masas hemos identificado varias familias de proteasas en promastigotes, siendo las más abundantes las familias de las metalo y cisteín proteasas. La identificación y caracterización de proteasas exportadas por este parásito, permitirá evaluar su participación en mecanismos de mantenimiento y supervivencia del parásito en la célula huésped.

Introducción

Los parásitos tripanosomatídios del género *Leishmania*, son los agentes causantes de las diferentes manifestaciones clínicas conocidas como leishmaniasis. Dependiendo de la especie del parásito implicada, las infecciones pueden ir desde lesiones leves en la piel hasta infecciones fatales a nivel visceral (7). Se estiman actualmente 12 millones de personas afectadas por esta enfermedad a nivel mundial, con una posible incidencia de 2 millones de casos nuevos anuales en zonas tropicales, subtropicales y en la cuenca mediterránea (16). El control eficiente de la leishmaniasis ha sido obstaculizado por la ausencia de una vacuna, la eficacia limitada de fármacos de primera línea y el aumento de la transmisión como resultado de coinfecciones con el VIH (4). Por tal motivo, una comprensión detallada de todos los aspectos involucrados en los procesos biológicos del parásito permitirá formular nuevas estrategias antiparasitarias (12).

Las diferentes formas morfológicas presentes en el ciclo de vida de *Leishmania* (promastigote en el insecto vector y amastigote en la vacuola fagolisosomal de células de mamíferos infectados), representan una adaptación del parásito a las diferentes condiciones ambientales dentro de sus dos hospedadores. Es decir, los parásitos requieren de factores proteicos que interactúen y modifiquen los ambientes intracelulares en los cuales se desarrollan

(12). Estas proteínas exportadas, garantes del proceso infeccioso, desempeñan un papel activo en las primeras interacciones huésped-parásito. Al conjunto de proteínas extracelulares liberadas de un organismo en condiciones definidas se le denomina exoproteoma (3,17).

Importancia de las proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania* en el proceso de integración hospedador-parásito

Durante el ciclo de vida de *Leishmania*, la supervivencia del parásito es garantizada gracias a las diferentes estrategias con que éste cuenta para contrarrestar los mecanismos de defensa de la célula huésped (3). Actualmente hay evidencias de que tanto promastigotes como amastigotes, son capaces de exportar al citoplasma de la célula huésped proteasas que modulan directamente las diferentes rutas de señalización celular del hospedador (9). Diferentes proteasas han sido identificadas en los exoproteomas de *Leishmania donovani* (14) y *Leishmania infantum* (12). Entre estas, cabe destacar: **1.** La Leishmanolisina o GP63, endoproteasa que comparte características con las metaloproteasas de mamíferos y es la proteína de superficie más abundante en promastigotes (18). A esta se le adjudica un rol central en los procesos de invasión tanto en las células epiteliales del vector como en el hospedador vertebrado (13). **2.** La cisteín proteasa B (CP-B) (5) y **3.** Una serín proteasa (1,2), ambas asociadas con

procesos de virulencia, invasión celular y la interacción hospedador-parásito.

Dada la importancia de las proteasas secretadas en los procesos adaptativos y de sobrevivencia en varias especies de *Leishmania* (9), se proponen como potenciales candidatas responsables del mantenimiento del parásito en la célula hospedera. Por tal motivo, nuestro interés es el de profundizar en la identificación de las proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*, como primer paso para establecer diferencias con las proteasas exportadas por amastigotes de la misma especie, a fin de identificar cuáles de ellas son específicas de cada estadio del parásito.

Proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes de Leishmania mexicana

Trabajos previos realizados en el laboratorio, nos han permitido demostrar la presencia de la actividad proteolítica de varias familias de peptidasas en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* (10). Interesantemente, hemos evidenciado un patrón proteolítico diferencial entre ambos estadios (10,11). Sugiriéndose con ello, la exclusividad de exportación de proteasas en los diferentes ambientes en que se desarrolla el parásito. Sin embargo, dada la baja expresión de estas peptidasas, la identificación de las mismas mediante técnicas de bioquímica clásica se hace muy difícil. Por tal motivo, nos hemos propuesto identificar las proteasas presentes en el exoproteoma mediante técnicas de proteómica como la espectrometría de masa, la cual gracias a su alta sensibilidad permite identificar proteínas presentes con un bajo número de copias (6).

Para proceder a la identificación de las proteínas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*, promastigotes de la cepa Bel21, en fase estacionaria de crecimiento, fueron incubados durante 24 h a temperatura ambiente en medio RPMI libre de suero (2×10^8 células/ml). Posteriormente los parásitos fueron removidos por centrifugación. Las proteínas presentes en el exoproteoma fueron precipitadas con metanol y se prepararon para su análisis por espectrometría de masas de tipo LC-MS/MS (Orbitrap). Los resultados obtenidos fueron analizados con el servidor de identificación de proteínas (MASCOT) utilizando las bases de datos SwissProt y NCBIInr. La lista de genes identificados, fue clasificada según su función biológica y tipo de proteína, mediante el programa "Gene Ontology Consortium/PANTHER" utilizando la base de datos de *Leishmania major* (8).

Bajo nuestras condiciones de estudio, se lograron identificar 124 proteínas en los productos excretados por promastigotes (Fig. 1). La caracterización de las proteínas en base a su función biológica (Fig. 1A), indica que la mayoría presentan función catalítica (59%) seguida de función de unión (22%) y función estructural (5%).

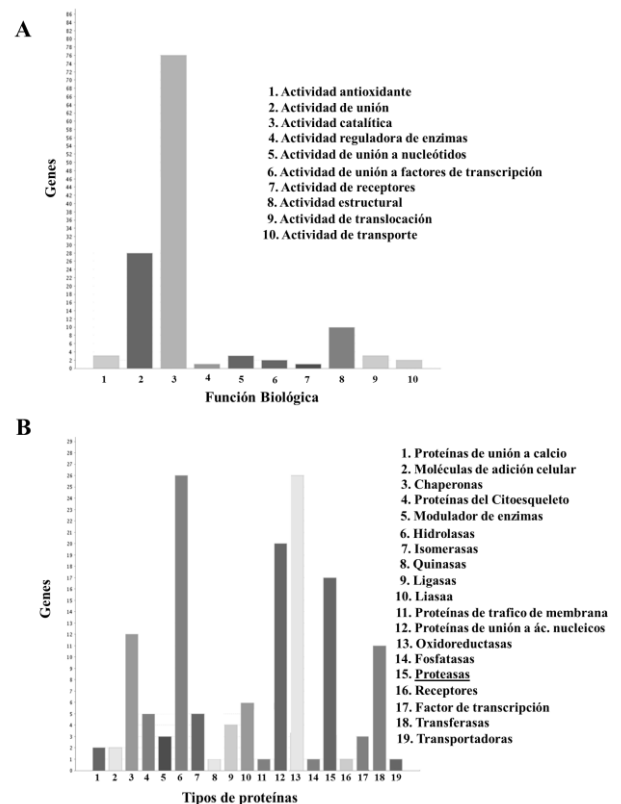


Figura 1. Clasificación de las proteínas presentes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*. **A.** En base a su función biológica. **B.** En base al tipo de proteínas. La clasificación de proteínas identificadas por espectrometría de masas fue realizada utilizando el programa "Gene Ontology Consortium/ PANTHER" (8).

Con respecto a la clasificación según el tipo de proteínas (Fig. 1B), las oxidoreductasas e hidrolasas resultaron ser las más abundantes (18%) seguidas de las proteínas de unión a nucleótidos (14%). Por su parte, las proteasas ocuparon la cuarta posición en abundancia (12%), siendo las familias de las metalo y cisteín proteasas las más abundantes en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Fig. 2). Las proteasas fueron identificadas mediante su análisis a través de relaciones evolutivas utilizando el programa "PANTHER" (8). El número de identificación del gen (GI), los pesos moleculares

aparentes y función molecular de las proteasas identificadas, se resumen en la Tabla 1.

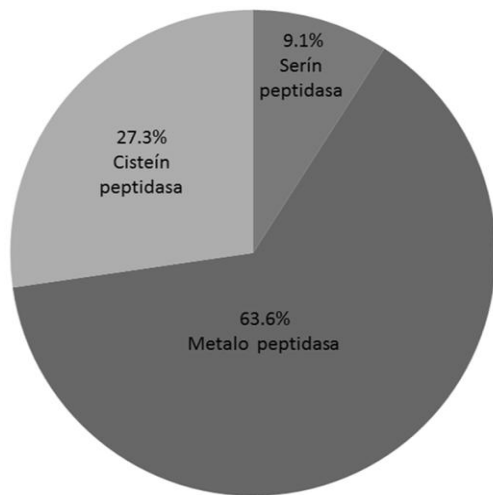


Figura 2: Familias de proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. La clasificación de las familias de proteasas identificadas por espectrometría de masas fue realizada utilizando el programa “Gene Ontology Consortium/PANTHER” (8).

Tabla 1. Proteasas identificadas en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Nombre ID <i>L. mexicana</i>	Familia	PM KDa	Función molecular (GO)
Oligopeptidasa b GI:401416529	Serín peptidasa, Clan SC, Familia S9A	83.4	•Serín peptidasa.
Cisteín proteinasa B GI:1730100	Cisteín peptidasa B tipo catepsina, Familia C1	47.7	•Cisteín peptidasa. •Primordialmente expresada en amastigotes.
4-methyl-5(beta-hidroxiethyl)-tiazol monofosfato GI:401425479	Cisteín peptidasa	20.5	•Cisteín peptidasa. •Factor de transcripción. •Péptido de unión al DNA y RNA.
Cisteín peptidasa tipo Calpaina Putativa GI:401424277	Cisteín peptidasa Clan CA, Familia C2	48.8	•Cisteín peptidasa. • Péptido de unión a Ca ²⁺ •Péptido de interacción con Calmodulina y con fosfolípidos dependiente de Ca ²⁺ .
Metallo peptidasa GI:401415676	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M1	96.3	•Metallo peptidasa.
GP63, Leishmanolisina GI:401416776 GI:401416778	Leishmanolisina	69.5 63.6	•Metallo peptidasa.
N-acil-L-aminohidrolasa Putativa GI:401426292	N-acil-L-amino aminohidrolasa Putativa	43.7	•Metallo peptidasa. •Actividad deacetilasa.
Peptidil dipeptidasa Putativa GI:401414348	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M3	76.4	•Metallo peptidasa.
Dipeptidil-peptidasa III GI:401414979	Metallo peptidasa, Clan M-, Familia M49	75.6	•Metallo peptidasa.
Oligopeptidasa putativa GI:401423944	Metallo peptidasa, Clan MA(E), Familia M3	76.9	•Metallo peptidasa.

En escala creciente de grises se indica el tipo de familia de proteasa identificada (serín, cisteín y metallo peptidasas, respectivamente).

Cabe destacar que además de la Leishmanolisina (GP63), la Cisteín peptidasa B y la Oligopeptidasa b, previamente identificadas como proteasas excretadas e importantes factores de virulencia (15), logramos identificar siete proteasas putativas cuya función como factor de virulencia aún se desconoce (Tabla 1).

En estos momentos nuestros esfuerzos están dirigidos a la identificación de proteasas en el exoproteoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*, con el fin de establecer posibles diferencias en cuanto a los mecanismos de mantenimiento y supervivencia del parásito dentro de sus dos hospedadores. Ello conduciría a establecer posibles nuevos blancos quimioterapéuticos que pudieran permitir el control de las enfermedades generadas por esta familia de parásitos.

Referencias

1. Choudhury, R., Bhaumik, S., De, T. y Chakraborti, T. (2009). Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.* **320**: 1-14.
2. Choudhury, R., Das, P., Bhaumik, S.K., De, T. y Chakraborti, T. (2010). In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**: 660-667.
3. Corrales, R., Sereno, D. y Mathieu-Daude F. (2010). Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**: 27-38.
4. Croft, S., Sundar, S. y Fairlamb, A. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 111-126.
5. Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. y Olivier, M. (2011). Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PloS One* **6**: 1-10.
6. Lin, D., Tabb, D. y Yates, J. (2003). Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1646**: 1-10.
7. McMahon-Pratt, D. y Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol. Rev.* **201**: 206-224.

8. **Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. y Thomas, P.** (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature Protocols** **8**: 1551-1566.
9. **Mottram, J., Coombs, G. y Alexander, J.** (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology** **7**: 375-381.
10. **Pérez-Gordones, M.C., Romero, P.J. y Hernández-Chinea, C.** (2012). Estudio de factores proteolíticos excretados por amastigotes de *Leishmania*. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **6**: 9-12.
11. **Pérez-Gordones, M.C., Romero, P.J. y Hernández-Chinea, C.** (2014). Análisis de la actividad proteolítica presente en el secretoma de amastigotes de *Leishmania mexicana*. **Memorias del Instituto de Biología Experimental** **7**: 9-12.
12. **Santarém, N., Racine, G., Silvestre, R. Cordeiro-da-Silva, A. y Ouellette, M.** (2013). Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. **Journal of Proteomics** **84**: 106-118.
13. **Santos, A., Branquinha, M.H. y D`Avila-Levy, C.M.** (2006). The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Cienc.** **78**: 687-714.
14. **Silverman, M., Chan, S., Robinson, D., Dwyer, D., Nandan, D., Foster, L. y Reiner, N.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology** **9**: R35 1-21.
15. **Silvia-Almeida, M., Santini, A., Lopes, M., y Roberto, C.** (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp.* Infection in mammals **Parasites & Vectors** **5**: 160-170.
16. **Stuart, K., Brun, R. y Croft, S.** (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** **118**: 1301-1310.
17. **Tonui, W., Mejia, J., Hochberg, L., Mbow, M., Ryan, J. y Chan A.** (2004). Immunization with *Leishmania major* exogenous antigens protects susceptible BALB/c mice against challenge infection with *L. major*. **Infect. Immun.** **72**: 5654-5661.
18. **Yao, C.** (2010). Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? **Infect. Immun.** **78**: 22-31.