

IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE CUBIERTA Y DE MEMBRANA EN MEROZOITOS DE *Plasmodium Falciparum*

ENID RIVADENEIRA*, MOISES WASSERMAN**., CARLOS A. ESPINAL***, PAULA M. MENDOZA*

Se identificaron proteínas que se desprenden fácilmente del merozoíto (probablemente proteínas de cubierta) y proteínas intrínsecas de la membrana por el fraccionamiento de parásitos marcados endógenamente y purificados. La marcación continua durante todo el ciclo aseguró la identificación de las proteínas independientemente de su tiempo de síntesis.

Este método permitió detectar proteínas de membrana, independientemente de su susceptibilidad a la digestión enzimática o a la marcación exógena.

Se identificaron 4 proteínas de 100, 75, 50 y 45 KD que probablemente son constituyentes de la cubierta del merozoíto.

En la fracción de membranas, solubles en detergente, se detectan 6 proteínas principales de 225, 86, 82, 75, 72 y 40 KD y 4 proteínas menores de 200, 69, 45 y 43 KD.

Este trabajo es una contribución a la caracterización de la superficie del merozoíto de *Plasmodium falciparum*.

INTRODUCCION

Las proteínas del *Plasmodium falciparum* responsables del reconocimiento y unión al eritrocito, están presumiblemente localizadas en la superficie del merozoíto.

Existe poca información sobre las proteínas que conforman su cubierta y su membrana. Udeinya y Van Dyke⁽¹⁾ detectan 5 glicoproteínas probablemente localizadas en la membrana del merozoíto. Perkins⁽²⁾ con base en la sensibilidad a la tripsina y quimotripsina, localiza tres proteínas de aproximadamente 200 KD, una muy prominente de 94 KD y una de 130 KD (sensible sólo a la quimotripsina). Heidrich y Col.⁽³⁾ identifican 6 proteínas expuestas a la radio-iodinación enzimática en la superficie del merozoíto, la mayor

de ellas de 81 KD, y la menor de 12 KD. Freeman y Holder⁽⁴⁾ utilizando una técnica similar identifican 11 proteínas entre 160 KD y 37 KD, la más prominente, de 83 KD, es producto del procesamiento del antígeno de 195 KD. (Holder y Freeman)⁽⁵⁾.

En este estudio se determinaron las proteínas que desprenden fácilmente de la superficie del merozoíto del *Plasmodium falciparum*, posiblemente constituyentes de la cubierta celular, y las proteínas intrínsecas de su membrana. Esta identificación se hizo por el fraccionamiento de los merozoítos purificados (Mrema et al)⁽⁶⁾ a partir de un cultivo marcado endógenamente durante todo un ciclo. El método empleado permite detectar todas las proteínas de membrana, independientemente de su susceptibilidad a la acción de enzimas proteolíticas o a la marcación exógena.

* Grupo de Bioquímica. Instituto Nacional de Salud.

** Profesor Bioquímica, Universidad Nacional.

*** Dirección Actual, Consultores Internacionales en Medicina Tropical. A.A. 100084 - Bogotá.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO de *Plasmodium falciparum*. Se utilizó la cepa colombiana de *P. falciparum* FCB-2 (Espinal y Col.)⁽⁷⁾. Los parásitos se cultivaron en cajas de Petri (Falcon-Oxnard California) según el método de "Candler Jar" Trager y Jensen⁽⁸⁾. La suspensión de eritrocitos grupo O(+) al 5% se preparó en medio RPMI-1640 suplementado con HEPES 25mM, NaHCO₃ 32 mM, hipoxantina 0,2mM, glutatión reducido 1mg/ml y suero humano al 10% obtenido de sangre O(+) e inactivo por calentamiento. El medio de cultivo se cambió una o dos veces al día según la parasitemia. Se hizo dilución con eritrocitos frescos cada 3-4 días.

COLECCION DE MEROZOITOS. Los merozoítos liberados espontáneamente se colectaron por el método descrito por Mrema y Col.⁽⁶⁾. El cultivo (144 ml, 5% anillos) se sincronizó inicialmente por tratamiento con sorbitol (Lambros y Vanderberg)⁽⁹⁾ y se incubó en medio RPMI-1640 suplementado, que contenía 0.04 mM metionina (sólo 40% de su contenido normal). A 36 ml de cultivo se agregaron 10 μ Ci/ml de ³⁵S-metionina (1245 Ci/mmol-NEN Boston). El medio se reemplazó cada 12 horas. Después de 40 horas de cultivo, se concentraron los esquizontes por centrifugación en gradiente de Percoll (Rivadeneira y Col.)⁽¹⁰⁾ y se cultivaron en ausencia de eritrocitos, ajustando el hematocrito a 0.25% y una parasitemia del 80%. Después de 6 horas, los merozoítos liberados se purificaron por filtración a través de membranas (Gelman, Versa-pore) de 3 y 1.2 μ M de poro (Mrema y Col.)⁽⁶⁾ y centrifugación a 2.500xg por 15 minutos. Los merozoítos recolectados lavados y resuspendidos en HBS (HEPES 20mM, pH 7.4 NaCl 160mM) con PMSF (Fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 1mM; TPCK (L-1-Tosilamida-2Fenil-metil-cloro-metil-cetona) 0.1 mM, TLCK (Na-p-Tosil-1-Lisínclorometil-cetona) 0.1 mM y ácido E-aminocaproico 0.5 mM. Se agitaron suavemente durante 10 minutos. Después de una nueva centrifugación, se guardó para análisis el sobrenadante que contenía las proteínas que desprenden fácilmente (cubierta). Las células se resuspendieron en 1 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 25 mM, MgSO₄ 5 mM, Sacarosa 0.25 mM, los inhibidores de proteasas y EGTA (ácido Etilen-glicol-bis-B-aminoetil- N.N'.N'.N'. tetraácetico) 0.5 mM.

FRACCIONAMIENTO DE LOS MEROZOITOS. Después de congelación (-70°C) y descongelación, los

merozoítos se sometieron a 4 pulsos de sonicación (60 Watt) de un minuto cada uno (Heat Systems Ultrasonic W220 F). El sonificado se centrifugó a 6.000xg durante 15 minutos. Se descartó el sedimento y el sobrenadante se centrifugó a 100.000xg durante 60 minutos. El sedimento de membranas y ribosomas resuspendido en PBS con inhibidores de proteasas y Triton X-100 1% se agitó durante 15 minutos. La suspensión se centrifugó a 100.000xg durante 60 minutos y el sobrenadante que contiene las proteínas de membrana se guardó para el análisis posterior.

ANALISIS DE LAS FRACCIONES. La radioactividad de las muestras se determinó por el método de Bollum⁽¹¹⁾. Las fracciones se analizaron en Electroforesis de geles de poliacrilamida - SDS. El gel concentrador de 5% Acrilamida (T=5.1%, C=2.4%) y el gel separador del 15% Acrilamida (T=15.2%, C=1.2%).

Los geles se colorearon con azul de Coocassie y se secaron.

Para la autorradiografía los geles se expusieron a film LKB ultrafilm a -70°C. La densitometría se realizó en un espectrofotómetro Pye Unicam SP.700.

Las membranas se procesaron para microscopía electrónica (Langreth y Col.)⁽¹²⁾ y se examinaron en un microscopio Zeiss, E.M. 109.

RESULTADOS

El cultivo de *Plasmodium falciparum* se marcó continuamente con ³⁵S-metionina durante un ciclo eritrocítico. Los merozoítos se purificaron y se sonicaron. Por centrifugación diferencial y extracción con detergente se aislaron varias fracciones.

La tabla 1, muestra el rendimiento de un experimento (uno de cuatro similares). El cultivo incorporó 9.2x10⁷ cpm de ³⁵S-Metionina en proteínas del parásito. Sólo 3.36x10⁷ cpm (36.5%) se recolectó en la fracción de esquizontes concentrada en el gradiente de Percoll. Después de la purificación de los merozoítos se recolectó 3.2x10⁵ cpm (3.4%). La fracción de proteínas débilmente asociada al merozoíto, se extrajo por agitación suave en medio isotónico: antígenos "fácilmente desprendibles (cubierta)" y representó el 0.1% 1.2x10⁵ cpm. Se estudió por electroforesis en Acrilamida - SDS y autorradiografía (Figura 1b).

IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE CUBIERTA Y DE MEMBRANA EN MEROZOITOS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

TABLA 1
OBTENCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA

FRACCION	³⁵ S-MET INCORPORADA C.P.M. TOTAL	PORCENTAJE DE CPM
Cultivo Sincronización(40hr)	92.001.000	100.0
Esquizontes Percoll	33.568.500	36.5
Merozoítos	3.150.000	3.4
Antígenos fácilmente desprendi- bles	123.300	0.1
Citosol	579.600	0.6
Membranas y ribosomas	921.900	1.0
Extracto proteínas de membrana	167.800	0.2

C.P.M. - Cuentas por minuto.

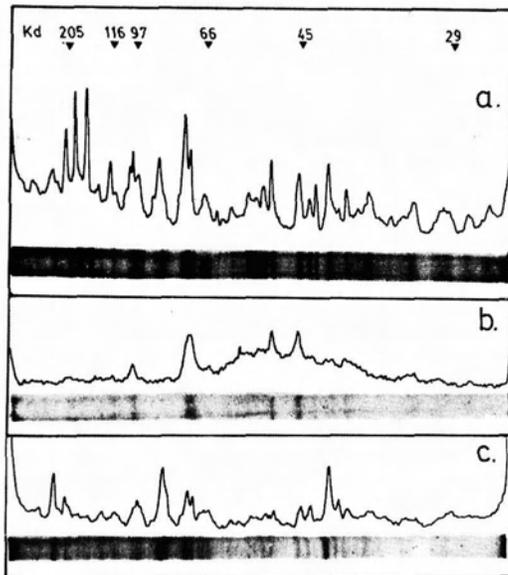


Fig. 1. Patrón de la electroforesis en acrilamida - SDS de proteínas del merozoíto de *P. falciparum*. Autorradiografías y densitograma de los patrones de: (a) proteínas de merozoítos; (b) proteínas fácilmente desprendibles (cubierta) y (c) proteínas de membrana. Los marcadores de peso molecular utilizados y su migración se señalan con flechas en (a).

Se distinguen tres bandas principales de 75, 50 y 45 KD. y una más débil de 100 KD.

Después de la centrifugación diferencial de los merozoítos sonicados, se obtuvo una fracción de vesículas de membranas y de material particulado, posiblemente ribosomas. (Figura 2a). La extracción con Triton X-100 solubiliza las vesículas de membranas y queda un residuo de material particulado (Figura 2b). Sólo 1.7×10^5 cpm, el 0.2% de la radioactividad inicial se recupera en el extracto soluble en Triton X-100. El análisis de la autoradiografía de esta fracción de membranas, (Figura 1c) es diferente del patrón de los merozoítos completos (Figura 1a) y de los antígenos "fácilmente desprendibles (cubierta)" (Figura 1b).

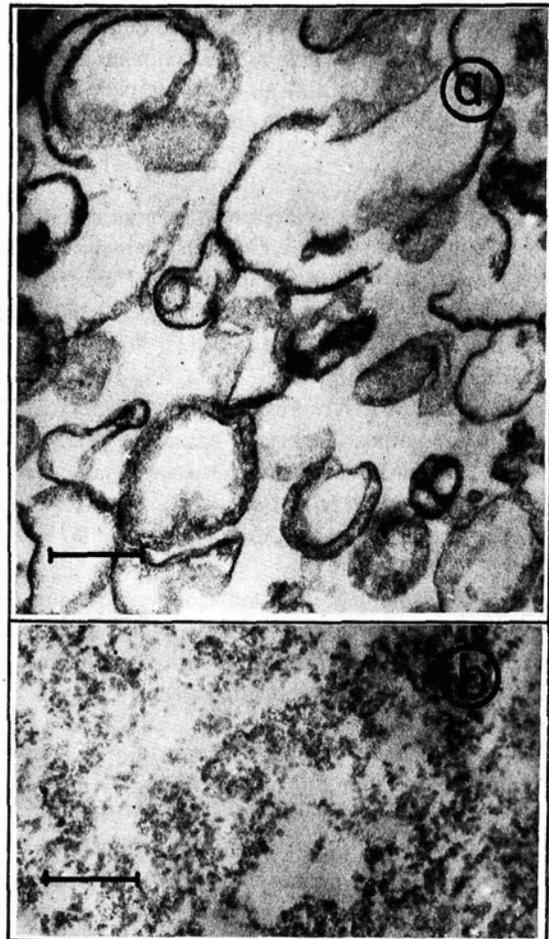


Fig. 2. Electromicrografía de preparación de membranas. Fracción de membranas antes (a) y después (b) de la extracción con detergente. La barra representa $0.25 \mu\text{m}$.

Las principales bandas de membrana tienen 225, 86, 82, 75, 72 y 40 KD.

Hay también bandas menores de 200, 69, 45 y 43 KD.

DISCUSION

Esta investigación presenta patrones de electroforesis en acrilamida SDS de proteínas fácilmente removibles del merozoíto, probablemente relacionadas con la cubierta celular, y proteínas de la preparación de membranas del merozoíto solubles en Triton X-100.

Las proteínas detectadas se obtuvieron por el fraccionamiento de merozoítos marcados endógenamente y por lo tanto la localización determinada de cada una de ellas es independiente del grado de exposición de las proteínas a factores externos. Es también independiente del tiempo de su síntesis durante el ciclo celular, dado que el parásito se marcó durante un ciclo completo.

La información en la literatura es contradictoria, usando técnicas de radio-iodinación enzimática para la marcación de proteínas expuestas del merozoíto, Heidrich y Col.⁽³⁾ detectan 6 proteínas de 81, 42, 38, 35, 20 y 12 KD y Freeman y Holder⁽⁴⁾ detectan 11 proteínas de 160, 105, 83, 73, 70, 65, 48, 42, 41, 38.5 y 37KD. Sólo hay tres proteínas que coinciden entre los dos grupos. Perkins⁽²⁾, basada en la sensibilidad de proteínas del merozoíto marcadas endógenamente a la acción de proteasas, detecta un triplete de 200 KD, una proteína de 130 KD y otra de 94 KD.

Esta diferencia entre laboratorios sugiere que el grado de exposición de ciertas proteínas al tratamiento enzimático depende de las condiciones experimentales y de la calidad de los merozoítos aislados.

Cuando Heidrich y Col.⁽³⁾, Freeman y Holder⁽⁴⁾ utilizaron suero inmune para detectar antígenos marcados endógenamente, obtuvieron patrones muy diferentes, sugiriendo que hay proteínas en la superficie del merozoíto que no están expuestas al sistema inmune del huésped. Sin embargo, esas proteínas pueden tener funciones en el reconocimiento e invasión del eritrocito. Los períodos de marcación endógena en dichos trabajos varía de 1 a 8 horas solamente, posiblemente un pulso demasiado corto, puesto que la

localización de las proteínas en la superficie del merozoíto puede ser independiente del tiempo de sus síntesis. En este estudio se utilizó un período de marcación extenso, prácticamente todo el ciclo.

Los resultados obtenidos muestran alguna coincidencia, por lo menos en 6 proteínas, con el patrón presentado por Freeman y Holder⁽⁴⁾.

El uso de procedimientos electroforéticos y de marcadores de peso molecular diferentes, puede producir incongruencias en la evaluación de los pesos moleculares (Saul y Col.)⁽¹³⁾.

La ausencia de proteínas fácilmente liberadas del merozoíto (figura 1b) en la preparación de membrana (figura 1c) es sorprendente y requiere un estudio cuidadoso de su localización exacta, de su posible función y del mecanismo de unión y de separación a la membrana.

El procedimiento técnico empleado permite identificar proteínas localizadas en membranas, pero no da información de su localización exacta en la célula o de su dirección en la bicapa.

Se requieren posteriores estudios para purificar membrana plasmática y lograr la caracterización de proteínas de superficie del merozoíto de *P. falciparum*.

Sin embargo los resultados reportados son útiles para la caracterización de proteínas de la membrana del merozoíto de *P. falciparum*.

SUMMARY

Proteins which are easily shed from the merozoite (probably coat proteins) and proteins intrinsic to the membrane, were identified in *Plasmodium falciparum* by fractionation of purified endogenously labelled merozoites. The method detects surface proteins also if they are not fully exposed to exogenous enzymatic actions. The continuous labelling during the whole cycle, ensures identification of proteins independently of their time of synthesis.

The proteins probably related to the coat of the merozoite had 100, 75, 50 and 45 KD. In detergent extract of the membrane fraction were detected 6 main proteins of 225, 86, 82, 75, 72, and 40 KD and 4 minor proteins of 200, 69, 45 and 43 KD.

The approach of this work is complementary to other efforts in the characterization of the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites.

BIBLIOGRAFIA

1. Udeinya IJ, and Van Dyke K. (1980). Labelling of membrane glycoproteins of cultivated *Plasmodium falciparum*. Bulletin of the World Health Organization 58: 445-448.
2. Perkins M. (1982). Surface proteins of schizont - infected erythrocytes and merozoites of *Plasmodium falciparum*. Molecular and Biochemical Parasitology 5: 55- 64.
3. Heidrich HG, Strych W, and Mrema JE. (1983). Identification of surface and internal antigens from spontaneously released *Plasmodium falciparum* merozoites by radio-iodination and metabolic labelling. Zeitschrift fur Parasitenkunde 69: 715-725.
4. Freeman RR, and Holder AA. (1983). Surface antigens of malaria merozoites. A high Molecular Weight precursor is Processed to an 83:000 Mol. wt. Form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* Merozoites. Journal of Experimental Medicine 158: 1647-1653.
5. Holder AA, and Freeman RR. (1982). Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. Journal of Experimental Medicine 156: 1528-1538.
6. Mrema JEK, Langreth SG, Jost RC, Reickemann KH, and Heidrich HG. (1982). *Plasmodium falciparum*: Isolation and Purification of spontaneously released merozoites by Nylon Membrane sieves. Experimental Parasitology 54: 285-295.
7. Espinal C, Moreno E, Guerra P. y De la Vega P. (1982). Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *Plasmodium falciparum*. BIOMEDICA 2: 118-129.
8. Trager W, and Jensen JB. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. Science 193: 673-675.
9. Lambros C, and Vanderberg JP. (1979). Synchronization of the *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. Journal of Parasitology 65: 418-420.
10. Rivadeneira EM, Wasserman M, and Espinal C. (1983). Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. Journal of Protozoology 30: 367-370.
11. Bollum FJ. (1966). In "Procedures in Nucleic Acid Research". Gl. Cantoni and R. Decies Eds pp 296-300 (New York: Harper and Row).
12. Langreth SG, Jensen JB, Reese RT, and Trager W. (1978) Fine structure of human Malaria In-vitro. Journal of Protozoology 25: 443-452.
13. Saul A, Myler P, Schofield L, and Kidson C. (1984). A high molecular weight antigen in *Plasmodium falciparum* recognized by inhibitory monoclonal antibodies. Parasite Immunology 6: 39-50.