

03081

8  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**RELACIONES ESTRUCTURALES ENTRE DOS  
PROTEINASAS DE *Entamoeba histolytica***

Tesis que para optar por el grado de :

**DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
(BIOQUIMICA)**

Presenta el M. en C. :

*Pedro Ulises G. Ostoa Saloma*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

MAYO, 1991.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

PROLOGO	2
CAPITULO 1 "PROTEASAS AMIBIANAS"	5
INTRODUCCION	6
a) Mecanismos citopatogénicos	10
b) Referencias	19
TRABAJO 1: "ROLE OF LEUKOCYTES AND AMEBIC PROTEINASES IN EXPERIMENTAL RAT TESTICULAR NECROSIS PRODUCED BY <u>Entamoeba histolytica</u>	24
TRABAJO 2: "STRUCTURAL RELATIONSHIPS BETWEEN TWO CYSTEINE PROTEINASES OF <u>Entamoeba</u> <u>histolytica</u>	49
CAPITULO II. "PROTEASAS Y SU MEDICION"	56
INTRODUCCION	57
a) Nomenclatura	58
b) Mecanismo de acción de las proteasas	60
c) Métodos para medir proteólisis	66
d) Métodos fluorométricos para medir proteólisis	68
e) Referencias	78
TRABAJO 3: "CAUSES OF THE DECREASE IN FLUORESCENCE DUE TO PROTEOLYSIS OF $\alpha$ -CASEIN	80
DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS	88
RESUMEN	93
ABSTRACT	94

## PROLOGO

Los trabajos que se presentan en esta tesis tienen un punto en común, todos ellos tratan acerca de un tipo particular de enzimas: las proteasas.

El estudio que aquí se hace de las proteasas es a diferentes niveles que va desde el desarrollo de un método para medir la actividad de estas enzimas hasta el análisis bioquímico de las mismas. Estos análisis contribuyen al estudio de la participación de las proteasas amibianas en la patología de la enfermedad parasitaria conocida como amibiasis. En ese sentido, la presente tesis tiene objetivos biotecnológicos y profilácticos.

La tesis esta compuesta por 2 capítulos. El primero se refiere al estudio de las proteinasas amibianas y el segundo comprende la descripción y el desarrollo de metodologías para medir la actividad proteolítica. Los capítulos incluyen una introducción al tema y un reporte en inglés. Se presentan 3 trabajos en un orden que no necesariamente expresa el de su realización. Los resultados incluidos son el producto del trabajo de varias personas cuyos nombres se presentan en los respectivos reportes.

Los trabajos 1 y 2 se concretan en el estudio de las proteasas de Entamoeba histolytica. Este parásito se caracteriza por su capacidad para degradar tejidos. Las proteasas de la amiba han sido reportadas como las principales responsables de la necrosis tisular. Tanto la patogenicidad como la virulencia son propiedades específicas de la relación huésped-parásito, sin

embargo, una de las preguntas más inquietantes en la patología general de la amibiasis es la naturaleza de la virulencia del parásito. En el trabajo número 1 se compara la relativa virulencia de diferentes cepas de E. histolytica con su respectivo patrón de zimograma tratando de contestar la pregunta de si hay una relación cualitativa o cuantitativa entre las proteasas amibianas y la virulencia del parásito. Se establece que en la producción de necrosis tisular, no sólo es importante el nivel de actividad proteolítica sino que también lo es el tipo de proteinasa producida por el parásito.

El trabajo 2 es el trabajo más corto y al que, paradójicamente, más tiempo se le dedicó. Los resultados que se presentan son un primer indicio de las relaciones estructurales entre 2 proteinasas de E. histolytica, por lo que estos resultados deben ser considerados como preliminares dado que es necesario hacer más experimentos para fortalecer las conclusiones que en el trabajo se vierten. Se decidió incluir estos primeros resultados, en forma de una comunicación corta, dentro de la tesis, advirtiendo que la conclusión de éstos puede variar en la medida que nuevos datos sean incluidos en la discusión.

El tercer trabajo, incluido en el capítulo 2, es el resultado de una necesidad metodológica: medir la actividad proteolítica de manera continua. Existen en el mercado sustratos que pueden ser utilizados para tal fin, sin embargo, estos son de un costo relativamente alto. Lo ideal es tener un sustrato natural, barato, que permitiera una alta sensibilidad y cuya proteólisis pudiera ser registrada de maneras continua. Los

resultados de este trabajo perfeccionan un método fluorométrico, para medir proteólisis, que ya habíamos reportado anteriormente, facilitando aún más su preparación; se da también una posible explicación molecular del proceso, lo que podría permitir idear un sustrato con características aún más completas.

Pedro Ostoa Saloma, 1991.

# CAPITULO 1

## *PROTEASAS AMIBIANAS*

ABSTRACT

The thesis has two chapters. The first chapter has two articles about proteinases of Entamoeba histolytica. In the first paper amebiasis was studied experimentally in the rats testis. The degree of inflammation and necrosis produced by different strains was correlated with proteinase activity and with zymograms. The results suggest that the pathogenic potential of Entamoeba spp. in the rat testis may be related to the type and the level of their proteolytic activity. The second paper is a preliminary report about the structural relationships between two proteinases of E. histolytica. Two "major" neutral cysteine proteinases were purified from extracts of HM-1 trophozoites and were compared using peptide mapping. The conclusion is that both proteins have substantial structural similarity.

Chapter two is about proteases and methods for the measurement of proteolytic activity. The chapter includes a paper where a method for the measurement of casein digestion, using fluorescence emission, is explained at molecular level. The results indicate that the particular environment of TRP in the sequences of the caseins is crucial for the decrease in fluorescence that is observed during the casein digestion. The reason that caseins and not other proteins, exhibit a decrease in fluorescence upon proteolysis is discussed.

Reino Osterholm

Reino Osterholm



## RESUMEN

La presente tesis esta dividida en dos capítulos. El primer capítulo se refiere a las proteinasas de Entamoeba histolytica. El capítulo comprende dos artículos. En el primero, se estudió la amibiiasis experimentalmente en el testículo de rata. El grado de inflamación, y necrosis producido por diferentes cepas de E. histolytica se correlacionó con la actividad proteolítica y con zimogramas tratando de contestar la pregunta de si hay una relación cualitativa o cuantitativa entre las proteasas amibianas y la virulencia del parásito. Se establece que en la necrosis tisular no sólo es importante el nivel de actividad proteolítica sino que también lo es el tipo de proteinasa producida por el parásito. El segundo artículo presenta los resultados preliminares acerca de la relación estructural entre dos proteinasas de E. histolytica. Dos proteinasas fueron purificadas de extractos de trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1. Las proteínas purificadas se compararon por medio de la técnica de mapas peptídicos unidimensionales. La conclusión es que ambas proteínas tienen una similitud estructural.

El capítulo 2 nos habla acerca de las proteasas y de los métodos para medir la actividad proteolítica. El capítulo incluye un artículo donde se explica a nivel molecular el descenso de la fluorescencia de la caseína durante la digestión de ésta. Los resultados indican que el medio ambiente del TRP que genera la señal es muy importante en el decremento de la fluorescencia observado durante la digestión de la caseína. Se discute la razón de porque sólo la caseína y no otras proteínas exhiben un decremento en la fluorescencia durante la proteólisis.

Rosario Pérez Montaña

Rosario Pérez Montaña

## INTRODUCCION

La amibiasis ha sido definida como la condición de poseer al parásito Entamoeba histolytica con o sin manifestación clínica (1). El ciclo de vida del parásito no requiere de la invasión destructiva de los tejidos dado que el parásito puede sobrevivir y reproducirse en el lumen del intestino, enquistarse y pasar junto con las heces fecales al exterior. Pero en algunos casos los trofozoitos destruyen la pared intestinal e invaden ésta causando lo que es conocido como amibiasis invasiva. No se saben con certeza las condiciones que permiten o inhiben ese comportamiento agresivo e incluso hay discusión acerca de la existencia de cepas de E. histolytica que sean permanentemente patógenas o no patógenas. En este punto, es necesario hacer una aclaración del concepto de patogenicidad y diferenciarlo del de virulencia. Patogenicidad es la capacidad de una determinada cepa de amibas para generar la enfermedad. Sobre esta base tenemos dos tipos: cepas patógenas y no patógenas. Por otra parte la virulencia se refiere al grado en que la patogenicidad se expresa y generalmente se gradúa arbitrariamente en alta, media y baja (2)

La gran capacidad de amibas patogénicas de lizar los tejidos fue la justificación para llamarle histolytica (1). Con la introducción de la endoscopia y el estudio de las biopsias se pudieron estudiar lesiones amibianas en sus primeras fases. Se encontró que las lesiones tempranas se acompañan por una reacción inflamatoria aguda con edema y leucocitos polimorfonucleares,

pero que este exudado desaparece rápidamente dejando sólo amibas y tejido destruido (3). En 1961, Diamond (4,5,6) hizo posible el cultivo de trofozoitos de E. histolytica bajo condiciones axénicas y esto fue un parteaguas en la amibiasis experimental. Muchos grupos empezaron a estudiar, usando diferentes modelos animales, las primeras reacciones en la interacción célula-amiba o tejido-amiba.

De estos estudios se desprendió que los mecanismos utilizados por cepas patógenas de E. histolytica para invadir o destruir los tejidos del hospedero, así como para evadir el sistema inmune, son variados. Incluyen el uso de receptores celulares (adhesinas), proteasas, excreción de factores líticos (fosfolipasas, ameboporo) y una movilidad membranal activa (Fagocitosis) (7,8). Todos estos factores, que no son mutuamente excluyentes y que pueden funcionar de manera conjunta, son los que principal- y activamente participan en la patogenicidad de E. histolytica. Esto implica que éste parásito como especie, es potencialmente patógeno, es decir, es capaz de invadir y hacer daño al hombre; pero su patogenicidad es latente y se expresa sólo cuando ciertas condiciones prevalecen. Esto significa que en el estado de comensal, que es el más común en el intestino, la expresión de la patogenicidad está suprimida, y sólo cuando los mecanismos de defensa inmunológica, y fisiológica del hospedero se rompen, se permite la expresión patogénica de la amiba. Otros investigadores consideran que la patogenicidad de E. histolytica siempre se esta expresando pero que las lesiones microscópicas no se detectan en condiciones normales y no causan una condición de enfermedad, dado que son constantemente

reparadas por el hospedero. Cuando el proceso de reparación falla o está por debajo del proceso invasivo, aparece la condición de enfermedad (9). Una tercera opinión establece que existen dos tipos de E. histolytica: patogénica y no patogénica. Esta hipótesis se basa en trabajos del análisis electroforético de isoenzimas amibianas. Todos los tipos de E. histolytica obtenidas de casos clínicos de amibiasis caen en 7 patrones de zimodemos (llamados patogénicos) y aquellos de portadores asintomáticos en 11 (llamados no patogénicos) (10). Actualmente se considera que estos zimodemos son marcadores pero no determinan la patogenicidad. Se ha utilizado el DNA de E. histolytica como marcador de patogenicidad. A decir verdad, el aislamiento y caracterización del DNA de E. histolytica está en la infancia. Se ha reportado recientemente la clonación de los genes que codifican para actina (61,62) y ferredoxina (63), así como el estudio de los genes que codifican para el RNA ribosomal (64). De estos trabajos se desprende que el DNA amibiano posee características que no comparten las otras células eucariontes, por lo que los métodos reportados para la purificación de DNA tienen que ser modificados en el caso de la amiba (65). Se ha encontrado que hay diferencias entre el patrón de restricción de DNA entre cepas patógenas y no patógenas (11,12). Se han reportado dos sondas moleculares que pueden diferenciar entre amibas patógenas y no patógenas, una de 145 pares de bases (pb) y la otra de 1.9 kilo bases (kb) que sólo hibridizan con DNA de amibas patógenas. Otras dos sondas, una de 145 pb y otra de 2.3 kb hibridizan con las cepas no patógenas probadas (66,67). Estas

diferencias argumentan en favor de que las cepas patógenas son genéticamente distintas de las no patógenas y por lo tanto son especies diferentes. Sin embargo no se descarta la conversión fenotípica dado que se ha reportado que otra sonda de también 145 pb hibridiza con todas las cepas de E. histolytica pero no con otras especies de Entamoeba como invadens o moshkovskii; esta sonda de 145 pb tiene relación con las otras dos sondas mencionadas anteriormente en que su secuencia tiene un alto contenido de adenina y timina. Esta última sonda se propone sólo para uso de diagnóstico clínico dado que no establece diferencia entre cepas patógenas y no patógenas (68).

El problema de las sondas moleculares es que son poco prácticas clínicamente, su utilización requiere una metodología muy elaborada y reactivos muy caros; es por eso que otros investigadores han propuesto el uso de anticuerpos monoclonales para la diferenciación de cepas patógenas y no patógenas. Hay al menos tres grupos que han reportado un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de peso molecular (p.m.) de 30 kiloDaltones (kDa.) de peso molecular (p.m.). Uno de ellos ubica este antígeno en la membrana plasmática de la amiba (69) y otro en la membrana nuclear y citoplasma (70). El tercer grupo no da la ubicación, pero exalta la importancia de los azúcares del antígeno en su reconocimiento por el anticuerpo (71). Otro antígeno, éste de 96 kDa, también ha sido reportado como indicador de patogenicidad. Este antígeno aparentemente sólo se detecta en la membrana plasmática de cepas patógenas de E. histolytica (72).

a) Mecanismos citopatogénicos.

Ameboporo. - Varios estudios sugieren que el contacto entre la célula blanco y la amiba es necesario para la lisis celular. Posterior al contacto, la célula blanco se hincha y redondea, en este estado la célula puede ser teñida con azul de tripán, y después de esto la célula es ingerida por la amiba.(13). En el contacto estrecho entre la amiba y la célula blanco se podría transmitir un elemento membrano-activo que pudiera afectar la permeabilidad iónica de la célula receptora. Actualmente se sabe que ese elemento existe y se le ha denominado: Ameboporo. Esta molécula se ha encontrado tanto en el medio de cultivo amibiano, lo que indica que es secretado, como en el interior de la amiba, en un estado agregado (14). En purificaciones del ameboporo se han obtenido 2 tipos de moléculas: un  $\alpha$  Ameboporo con punto isoeléctrico (p.i.) de 6.8 y un  $\beta$  Ameboporo con p.i. de 5.3; ambos con un p.m. de 30 (kDa). Aparentemente estas moléculas están compuestas de 2 subunidades, ya que en una electroforesis en condiciones desnaturizantes se observa una banda con un p.m. de 15 kDa (15).

Lectinas. - La adhesión de los trofozoitos de E. histolytica a células epiteliales, es el primer paso en los mecanismos de citolisis (16,17,18,) y fagocitosis (19). Tres hallazgos comprueban esta hipótesis:

1.- Se requiere el contacto directo de los trofozoitos con la célula blanco para que ocurra la lisis de ésta (17,18).

2.- La adhesión de los trofozoitos a la célula blanco se inhibe con N.acetil-Galactosamina (Gal.Nac), y este carbohidrato también inhibe la muerte de la célula blanco (18,20).

3.- Clonas de E. histolytica deficientes en adhesión también son deficientes en fagocitosis y en efecto citopático, tanto "in vivo" como "in vitro" (19).

E. histolytica contiene al menos 2 lectinas con diferente carbohidrato como blanco (citotriosa y Gal.Nac) (21). Se ha purificado la lectina inhibible con Gal.Nac. Esta lectina tiene un p.m. de 260 kd y en condiciones reductoras se divide en dos subunidades: una de 170 y otra de 35 kDa (22). Por otra parte se ha reportado la localización de otra lectina a través de anticuerpos monoclonales, que tiene un p.m. de 112 kDa y que está ausente en mutantes deficientes en adherencia (23). Experimentos de competencia, muestran que la lectina de germen de trigo tiene una afinidad similar a la lectina inhibible por citotriosa y tiene un marcado efecto inhibitorio sobre la adherencia de las amibas; estos resultados hacen suponer un parentesco entre estas dos lectinas. Se tiene la secuencia parcial del amino terminal y fragmentos proteolíticos de la lectina Gal.Nac. Con esta secuencia se ha generado una sonda que ha identificado un mRNA de 3.6 Kb para la subunidad pesada y 1.2 Kb para la subunidad ligera (25).

Fosfolipasas.-Tanto las fosfolipasas como los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos, han sido relacionados con la capacidad destructora de E. histolytica. Las fosfolipasas amibianas pueden dañar a las células interactuando directamente

con los fosfolípidos de la célula blanco o pueden producir moléculas líticas como subproductos de degradación de fosfolípidos amibianos o de la célula blanco (26). En homogenados de E. histolytica se detectaron dos picos de actividad para la fosfolipasa A: una actividad dependiente de  $Ca^{++}$  y otra independiente de  $Ca^{++}$  (27) Estas enzimas parcialmente purificadas tienen un p.m. aparente de 39 kDa. Usando varios inhibidores para fosfolipasa A de otras células eucariontes se encontró que la fosfolipasa A de la amiba también se inhibe.

En la amiba también se ha reportado la actividad de la fosfolipasa C pero no se sabe mucho acerca de las propiedades moleculares de esta enzima amibiana.

Fagocitosis.- El papel de la fagocitosis fue establecido por estudios de Orozco et al. (28,29,30). Estos autores aislaron y clonaron mutantes deficientes en fagocitosis y mostraron que sus aislados no eran patogénicos "in vivo". Además, revertantes derivadas de estos mutantes, seleccionados por su habilidad a producir absceso hepático en hamsters, recuperaron su capacidad fagocítica original. La fagocitosis es un fenómeno extremadamente complejo, tal vez sea el resultado de otros procesos biológicos tales como quimiotaxis, reconocimiento celular, adhesión, ingestión, digestión o exocitosis. En ese sentido, la fagocitosis no debería considerarse como un proceso único, sino como un conjunto de procesos.

Proteasas.- Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos (31). Las proteasas de los parásitos facilitan la invasión a los tejidos del hospedero y,



digiriendo las proteínas de éste, ayudan a la evasión de la respuesta inmune; o mimetizan las proteasas del hospedero provocándole fibrinólisis e incremento en la permeabilidad muscular (32). Por esta razón las proteinasas de los parásitos han sido blancos potenciales para agentes inmunoterapéuticos o quimioterapéuticos y en algunos casos, han sido utilizados como reactivo para serodiagnóstico, o de detección del parásito. Se han detectado varias proteinasas de E. histolytica (Tabla 1), la mayor parte de ellas pertenecientes a la clase catalítica de cisteína (33). Una metaloproteinasa (Colagenasa) ha sido descrita (34,35) y también una proteínasa de aspártico (Catepsina D) (37,53). La participación de las proteasas de E. histolytica en la invasividad, fue poco favorecida inicialmente por la observación de que sólo dos de cinco cepas de amibas extraídas de pacientes con disenteria, presentaban una actividad proteolítica alta y las otras tres mostraban baja actividad (57). También se reportó el hecho de que no se encontró una correlación entre el grado de actividad proteolítica y el tamaño de las lesiones producidas por la amiba (58). Cabe aclarar que estos experimentos se hicieron con amibas provenientes de cultivos monoxénicos o polixénicos. Reeves (59) encontró que el espectro enzimático de amibas cultivadas en condiciones xénicas difería de aquel encontrado en las amibas cultivadas en condiciones axénicas, por lo que los resultados anteriores deben ser tomados con cautela. Recientemente se han reportado resultados que intentan explicar la necrosis tisular característica de las lesiones amibianas. En uno de ellos (60) utilizando como modelo al hamster, se plantea que la necrosis tisular es producto de las enzimas hidrolíticas

TABLA I

ACTIVIDADES PROTEOLITICAS DESCRITAS EN *Entamoeba histolytica*

Condiciones de cultivo	Cepa	Actividad proteolítica	Proteasas	Peso Molecular (kDa)	Ref
Monoxénico	P+A'	Caseinasa	-	-	(46)
Xénico	R, P+A'	Gelatinasa	-	-	(47)
Monoxénico	HUS 105 HUS 100 Washington Griffith ROK, Conrad	Gelatinasa	-	-	(48)
Monoxénico	HUS 105 Washington	Caseinasa	-	-	(49)
Monoxénico	P+A', AR, DC, LO, G32 ST, 36719 LOBO, 10236	Caseinasa Gelatinasa Hemoglobinasas Fibrinasa	Tripsina	-	(50)
Monoxénico	P+A', AR, DC, LO, G32 ST, 36719 LOBO, 10236	Substratos "específicos"	Tripsina Pepsina Aminopeptidasa Dipeptidasa	-	(51)
Axénico	Saskatchewan	Hemoglobinasas Caseinasa	Catepsina D Catepsina B	41 27	(37)
Axénico	HK-9	Citotóxica	Proteasa de cisteína	35 40	(52)
Axénico	HM-1	Colagenasa	Colagenasa	40	(34)
Axénico	HM-1	Citotóxica	Proteasa de aspártico, serina o cisteína.	68,65 58,25	(53)
Axénico	HM-1	-	Catepsina B o L	21	(54)
Axénico	HM-1	-	Catepsina B	16,5 35,39 43,48	(43)
Axénico	HM-1	-	Proteasa de cisteína	-	(55)
Axénico	HM-1	Hemoglobinasas	Catepsina B	22	(36)
Axénico	HM-1	-	Proteasa de cisteína	56	(41)
Axénico	HK-9	-	Proteasa de cisteína	32,26 16	(8)
Axénico	HM-1	Colagenasa	Colagenasa	70	(56)
Axénico	HM-1	Citotóxica	Proteasa de cisteína	26	(40)
Axénico	HM-1	Gelatinasa Caseinasa	Proteasa de cisteína	73,45,36 30,26,23	(39)

de los leucocitos polimorfonucleares que son atraídos por factores quimiotácticos liberados por la amiba. Estos leucocitos entran en contacto con la amiba e inmediatamente mueren, posiblemente a través de la acción del ameboporo, fosfolipasa A o algún otro mecanismo citopatogénico. Los leucocitos muertos liberan sus enzimas y en consecuencia son éstas las responsables del daño tisular que se observa. En otro modelo experimental (38), Becker inyectó un millón de trofozoitos de la cepa HM-1 axénicamente cultivados en el tejido subcutáneo de ratas Wistar leucopénicas y estudió las lesiones en varios tiempos. El grado de destrucción tisular fue indistinguible del encontrado en las ratas controles excepto por la ausencia de leucocitos polimorfonucleares. De los resultados de este modelo experimental se puede concluir que los leucocitos polimorfonucleares no son necesarios para la necrosis tisular. En otro modelo experimental, utilizando testículo de rata, se observaron los mismos resultados (2)

Hay varias razones para plantear que las proteinasas de la amiba son las moléculas responsables de la necrosis tisular experimental : a) la inhibición del 80% de la actividad proteolítica de trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1, crecidos axénicamente, por  $\alpha$ 2Macroglobulina ( $\alpha$ 2-M) humana, bloquea efectivamente su capacidad para producir necrosis tisular sin afectar la viabilidad de las amibas. En el experimento control, en el que se inyectó el mismo número de amibas de la misma cepa, se observó un rápido desarrollo de la destrucción del tejido

seguido de una inflamación aguda con gran afluencia de leucocitos polimorfonucleares; En el grupo tratado con  $\alpha$ 2-M., también hubo inflamación pero sin necrosis (38). b) Hay correlación positiva entre el nivel de actividad colagenolítica de varias cepas y su capacidad de producir abscesos hepáticos (35). c) Las amibas patógenas son capaces de producir necrosis tisular en la ausencia de leucocitos polimorfonucleares. En testículos de animales leucopénicos (menos de 1000 LPN/ml) que fueron tratados con un millón de trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1, hubo desarrollo de necrosis tisular en el mismo grado que los controles, a pesar de la ausencia de leucocitos polimorfonucleares (2). d) Trofozoitos de E. histolytica axénicamente cultivados y tratados con galactosa (que inhibe su citotoxicidad in vitro ya que interfiere en su adhesión a la célula blanco) son capaces de producir necrosis tisular cuando se inyectan en el testículo de rata. Por otra parte se ha demostrado al mismo tiempo que es posible disociar experimentalmente citotoxicidad e histotoxicidad, lo que implica que sus mecanismos no son necesariamente los mismos (2).

Como ya se ha planteado aquí, tanto la patogenicidad como la virulencia de cepas axénicas de E. histolytica han sido atribuidas a una variedad de enzimas proteolíticas, sin embargo, hasta la fecha no se habían establecido patrones de zimograma para cepas con distintos grados de virulencia. Por lo tanto, el objetivo del trabajo # 1 es el de establecer una correlación entre estos dos factores con la esperanza de que ésta sea información útil y pueda explicar las diferencias en virulencia (medida por actividad proteolítica) entre las diferentes cepas de

### E. histolytica.

Los lisados de E. histolytica cepa HM-1 muestran seis distintas zonas de lisis con diferente peso molecular cuando se analizan por medio de electroforesis en gel de sustrato (zimograma). De estas seis especies moleculares las cinco más pequeñas están asociadas con fracciones subcelulares que presentan membranas internas o membrana plasmática; la de mayor peso molecular se encuentra enriquecida en la fracción soluble. Esta observación correlaciona muy bien con la separación de estos componentes de acuerdo a su hidrofobicidad. Los cinco componentes de bajo peso molecular se comportan como proteínas hidrofóbicas, y el sexto se comporta como proteína hidrofílica (39). El número preciso de proteinasas de cisteína aislada parece depender del sistema empleado en la purificación; utilizando tiol-sefarosa algunos autores han separado tres polipéptidos de bajo peso molecular (8). Luaces y Barrett han reportado la purificación de una proteína con actividad proteolítica con un peso molecular de 26 a 29 kDa a la que llamaron: "histolisina" (40). Por otra parte, Keene y colaboradores (41) purificaron una proteinasa de E. histolytica, con un peso molecular de 56 kDa., a partir del medio de incubación por lo que consideraron que esta enzima es excretada. Se le atribuyó un papel en la patogenicidad del parásito por su capacidad de degradar un modelo de matriz extracelular, así como laminina, fibronectina y colágena tipo I. Además se ha reportado que esta proteinasa puede activar complemento por la ruptura del componente C3 y en ese sentido jugar un papel en la respuesta inflamatoria que se observa en los

primeros momentos de las lesiones amibianas (42).

Tanto la enzima purificada por Luaces y Barret como la purificada por Keene tienen una similitud en la especificidad de sustrato ( para péptidos sintéticos con aminoácidos positivamente cargados en la posición P1 o P2), una dependencia similar de agentes reductores para su actividad y perfiles idénticos de inhibición, por lo que es probable que éstas enzimas purificadas de manera diferente representen productos de genes similares o idénticos. Las diferencias en el peso molecular de estas y otras preparaciones (43), pueden ser debidas a diferencias en los protocolos de purificación que den como resultado la formación de polímeros o la secreción de proenzimas de alto peso molecular. Se han detectado precursores de proteinasas de cisteína en células neoplásicas (44) y fibroblastos transformados; además, el análisis de la secuencia de un gene que codifica para la histolisina indica que esta enzima se sintetiza como una proenzima (45). El objetivo del trabajo # 2 es el de encontrar una posible relación estructural entre la proteinasa de peso molecular de 27 kDa y la de 56 kDa.

b) Referencias.

- 1.- Martinez-Palomo, A., The biology of Entamoeba histolytica. Research Studies Press/Wiley, Chichester, 1982.
- 2.- Perez-Tamayo, R., Becker, I., Montfort, I., and Perez-Montfort, R. Pathobiology of Amebiasis, in Amebiasis: Infection and Disease. Kretschmer, R.R. Ed., CRC Press, 1990, 123.
- 3.- Perez-Tamayo, R., Pathology of Amebiasis, in Amebiasis, Martinez-Palomo, A., Ed., Elsevier, Amsterdam, 1986, 45.
- 4.- Diamond, L.S. 1961. **Science**. 134: 366.
- 5.- Diamond, L.S. 1968. **J. Parasitol.** 54: 1047.
- 6.- Diamond, L.S., D.R. Harlow, C.C. Cunnick. 1978. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 72: 431.
- 7.- Ravdin, J.I. and Guerrant, R.L. 1982. **Rev. Infect. Dis.** 4: 1185.
- 8.- Gitler, C. and Mirelman, D. 1986. **Ann. Rev. Microbiol.** 40: 237
- 9.- Meerovich, E. and Chadee, K. In vivo models for pathogenicity in Amebiasis, in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 177.
- 10.- Sargeant, P.G., Baveja, U.K., Nanda, R., et al. 1984. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 78: 96.
- 11.- de la Cruz Hernández, F., Ocadiz, J.R., Orozco, E. 1986. **Arch. Inv. Med.** 17(Supl 1): 107.
- 12.- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., and Diamond, L.S., 1988. **Mol. Biochem. Parasitol.** 27: 257
- 13.- Lynch, E.C. Rosenberg, I., Gitler, C., 1982. **The EMBO J.** 1(7): 801.
- 14.- Young, J.D-E., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C. and Cohn, Z. 1982. **J. Exp. Med.** 156: 1677.
- 15.- Rosemberg, I., Bach, D., Loew, L.M., and Gitler, C. Ionophore Activity (Amoeba pore) of Entamoeba histolytica, in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 273.
- 16.- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., et al. 1982. **Arch Inv. Méd.** 13(Supl 3): 159.

- 17.- Ravdin, J.I., Croft, B.Y., Guerrant, R.L., 1980. *J. Exp. Med.* 152: 377.
- 18.- Ravdin, J.I., Guerrant, R.L., 1981. *J. Clin. Inv.* 68: 1305.
- 19.- Garcia Rivera, G., Sanchez, T., Orozco, E., et al., 1982. *Arch. Inv. Med.* 13(Supl 3): 129
- 20.- Ravdin, J.I., Murphy, C.F., Salata, R.A., Guerrant, R.L., and Hewlett, E.L., 1985. *J. Infect. Dis.* 151: 804.
- 21.- Ravdin, J.I., Petri, W.A. jr., and Mirelman, D., Mechanism of Adherence by Entamoeba histolytica. in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 205.
- 22.- Petri Jr. W.A., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F., and Ravdin, J.I. 1987. *Infect. Immun.* 55: 2327.
- 23.- Arroyo, R., and Orozco, E., 1987. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23: 151.
- 24.- Kobiler, D., and Mirelman, D. 1981. *J. Infect. Dis.* 144: 539.
- 25.- Mann, B.J., and Petri, W.J. Jr. 1989. Cloning and characterization of a galactose inhibitable surface lectin of Entamoeba histolytica. In: XI Seminario sobre Amibiasis. 15-17 de Noviembre. México, D.F.
- 26.- Long-Krug, S., and Ravdin, J.I. 1988. The role of amebic phospholipases in cytolysis of target cells by Entamoeba histolytica. in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 232.
- 27.- Long-Krug, S., Fischer, K.J., Ravdin, J.I. 1985. *J. Infect. Dis.* 152: 536.
- 28.- Orozco, E., de la Cruz-Hernández, F., and Rodriguez, M., Virulence related properties in Entamoeba histolytica. in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 314.
- 29.- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A., and Sanchez, T., 1983. *J. Exp. Med.* 158: 1511.
- 30.- Orozco, E., Rodriguez, M.A., and de la Cruz, F., The role of Phagocytosis in the pathogenic mechanism of Entamoeba histolytica. in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 326.
- 31.- Barrett, A.J. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues.* Barret A.J. ed. Elsevier North Holland Biomedical Press.



Amsterdam. 1977.

- 32.- McKerrow, J.H. 1989. **Exp.Parasitol.** 68: 111.
- 33.- Lushbaugh, W.B. Proteinases of *Entamoeba histolytica*. in Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987. 219.
- 34.- Muñoz, M.L., Calderón, J., and Rojkind, M., 1982. **J.Exp.Med.** 155, 42-51.
- 35.- Rojkind, M., Rosales-Encina, J.L., and Muñoz, M.L. The collagenase of *Entamoeba histolytica*, in Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*, Ravdin, J.I., Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 263.
- 36.- Lushbaugh, W.B., A.F. Hofbauer, F.E. Pittman., 1984. **Gastroenterology.** 87: 17.
- 37.- McLaughlin, J., and Faubert, G., 1977. **Can.J.Microbiol.** 23: 420.
- 38.- Becker, I., Perez-Tamayo, R., Montfort, I., Alvizouri, A.M., and Perez-Montfort, R. 1988. **Exp.Parasitol.** 67: 268.
- 39.- Ostoa-Saloma, P. Cabrera, N., Becker, I., and Perez-Montfort, R. 1989. **Mol.Biochem.Parasitol.** 32: 133.
- 40.- Luaces, L., and Barrett, A.J. 1988. **Biochem. J.** 250: 903.
- 41.- Keene, W.E., Pettitt, M.G., Allen, S., and McKerrow, J.H., 1986. **J.Exp.Med.** 163: 536
- 42.- Reed, L.R., Keene, W., McKerrow, J. and Gigli, I. 1989. **J.Immunol.**, 143: 189.
- 43.- Lushbaugh, W.B., Hofbauer, A.F., and Pittman, F.E., 1985. **Exp.Parasitol** 59: 328.
- 44.- Sloane, B.F., Rozhin, J., Hatfield, J., Crissman, J.D., and Honn, K.V., 1987. **Exp. Cell. Biol.** 55: 209.
- 45.- Bouvier, J., Sikes, A., Keene, W.E., Reed, S., and McKerrow, J.H., 1989. The thiol proteinase of *Entamoeba histolytica*: cloning of the gene and review of its role as a virulence factor. In: XI Seminario sobre Amibiasis. del 15 al 17 de Noviembre. México, D.F.
- 46.- Neal, R. **Nature.** (1956). 178. 599-601
- 47.- Harinasuta, C.A. and Maegraith, B.C. 1958. **Ann.Trop.Med.Parasitol.** 52: 508.
- 48.- Nakamura, M. and Edwards, P.R. 1959. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.** 100: 403.

- 49.- Nakamura, M., and Edwards, P.R. 1959. *Nature*. 183: 397.
- 50.- Jarumilinta, R. and B.C. Megaraith. 1961. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 55: 505.
- 51.- Jarumilinta, R., and Megaraith, B.C., 1961. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 55: 518.
- 52.- Bos, H.J., Leijendekker, W.J., Van den Eijk, A.A., 1980. *Exp. Parasitol.* 50: 342.
- 53.- McGowan, K., C.F. Deneke, G.M. Thorne, S.L. Gorbach *J. Infect. Dis.* (1982) 146: 616.
- 54.- Scholze, H. and E. Werries. 1984. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11: 293
- 55.- Perez-Montfort, R., Ostoa-Saloma, P., Velazquez-Medina, L., Montfort, I., Becker, I., 1987. *Mol. Biochem. Parasitol.* 26: 87
- 56.- Rosales-Encinas, J. and M. Rojkind. 1987. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Strategies of Parasite Invasion*. Alan R. Liss Inc. 1987 559.
- 57.- Neal, R.A., 1960. *Parasitology*, 50: 531.
- 58.- Jarumilinta, R., and Maegraith, B.G., 1969. *bull WHO* 41: 269
- 59.- Reeves, R., 1984. *Adv. Parasitol.* 54: 1047.
- 60.- Tsutsumi, V., Mena-López, R., Anaya-Velázquez, F., and Martínez-Palomo, A., 1984. *Am. J. Pathol.* 117: 81.
- 61.- Edman, U., Meza, I., and Agabian, N., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 3024.
- 62.- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S., 1987. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 227.
- 63.- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S., 1988. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31: 27.
- 64.- Huber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S., and Garfinkel, L., 1989. *Mol. Bioch. Parasitol* 32: 285.
- 65.- Albach, R.A., 1989. *J. Protozoology* 36(2): 197.
- 66.- Garfinkel, L., Giladi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S., 1989. *Infect. and Immun.* 57: 926.
- 67.- Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J., and Arnold, H.H. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 5118.

- 68.- Samuelson, J., Acuna-Soto, R., Reed, S., Biagi, F., and Wirth, D.  
1989. *J. Clin. Microbiol.* 27(4): 671.
- 69.- Blakely, P., Sargeant, P.G., and Reed, S.L. 1990. *J. Infect. Dis.* 162: 949.
- 70.- Tachibana, H., Kobayashi, S., Kato, Y., Nagakura, K., Kaneda, Y., and Takeuchi, T., 1990. *Infect. and Immun.* 58(4): 955.
- 71.- Bhattacharya, A., Ghildyal, R., Bhattacharya, S., and Diamond, L. 1990. *Infect. and Immun.* 58(10): 3458.
- 72.- Torian, B.E., Reed, S.L., Flores, B., Creely, C., Coward, J., Vial, K., and Stamm, W., 1990. *Infect. and Immun.* 58(3): 753.

# TRABAJO 1

Perez-Tamayo, R., Becker, I., Montfort, I.,  
Ostoa-Saloma, P., and Perez-Montfort, R.,  
1991. ROLE OF LEUCOCITES AND AMOEBIC  
PROTEINASES IN EXPERIMENTAL RAT  
TESTICULAR NECROSIS PRODUCED BY  
*Entamoeba histolytica*. Parasitol. Res. EN  
PRENSA.



Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your contribution *Role of leucocytes and amoebic proteinases in experimental rat testicular necrosis produced by Entamoeba histolytica*

has been accepted for publication in **Parasitology Research**. Your manuscript will go through the normal copy-editing process. If the corrections are extensive, the paper will be returned to you for outstanding questions to be resolved. It may even be necessary for you to have the paper retyped. If the copy-editing corrections are minimal, the typescript will be sent directly to the publisher for processing:

Springer-Verlag, Journal Production Department, Box 1052 80, D-6900 Heidelberg 1, Federal Republic of Germany.

Sincerely yours,

i.A. RoduŃ

ROLE OF LEUKOCYTES AND AMEBIC PROTEINASES IN  
EXPERIMENTAL RAT TESTICULAR NECROSIS  
PRODUCED BY Entamoeba histolytica

R. Pérez-Tamayo<sup>1</sup>, I. Becker<sup>1</sup>,  
I. Montfort<sup>1</sup>, P. Ostoa-Saloma<sup>2</sup>, and  
R. Pérez-Montfort<sup>2</sup>

From: <sup>1</sup>Sub-División de Medicina Experimental, Facultad  
de Medicina, and <sup>2</sup>Departamento de Microbiología,  
Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional  
Autónoma de México, México City, 04510, México

Running title: Leukocytes and proteinases in amebiasis

\*Corresponding address:

Ruy Pérez-Tamayo  
Sub-División de Medicina Experimental  
Facultad de Medicina, UNAM  
Apartado Postal 70-641  
04510 México, D.F.  
M E X I C O

#### ABSTRACT

In order to investigate the role of amebic proteinases and host leukocytes, amebiasis was studied experimentally in the rat testis. The degree of inflammation and necrosis produced by different strains was correlated with proteinase activity and with zymograms. Intratesticular injection of axenically grown trophozoites of a pathogenic strain (HM-1 of E. histolytica) produced lesions indistinguishable in normal rats and leukopenic rats (less than 1,000 leukocytes/mm<sup>3</sup>) suggesting that in this model granulocytes do not contribute to the formation of lesions. Testicular lesions produced by five different strains of E. histolytica ranging from highly virulent to almost non-pathogenic were proportional to the proteinase activity of each amebic strain. Inhibition of amebic proteinases in vitro and subsequent injection into the rat testis markedly reduced the inflammatory lesions resulting from highly virulent E. histolytica. The pathogenicity of three other amebae (E. laredo, E. moshkovskii and E. invadens) was generally proportional to their proteinase activity, however, E. laredo showed high proteinase activity and caused minimal tissue damage. These results suggest that the pathogenic potential of *Entamoeba* spp. in the rat testis may be related to the type as well as the level of their proteinase activity.

## INTRODUCTION

Currently the procedure of choice to assess in vivo the virulence of axenically grown trophozoites of E. histolytica is to induce abscesses in the liver of newborn hamsters (Gitler and Mirelman, 1986). In this report we describe a new model of acute experimental amebiasis in the rat produced by the intratesticular injection of axenic trophozoites. The lesions are acute inflammation and necrosis; amebas disappear from the tissue in 10 hours but the lesions are retained for several days. In comparison with the newborn hamster model, the rat testicular model of acute amebiasis is less expensive, simpler to perform, quicker (48 hours versus 7 days) and has an ideal control (the opposite testis in the same animal). With this model we have examined the respective roles of host leukocytes and amebic proteinases in the pathogenesis of amebic tissue damage. In addition, we have also used this experimental model to compare the virulence of different amebic strains and to correlate it with their zymograms and proteinase activity.

## MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Wistar rats weighing 400-500 g obtained from our own colony were used in all experiments; they were kept in plastic cages and fed Purina



pellets and water ad libitum. All injections were performed under ether anaesthesia. At the end of the experiments, the animals were anesthetized and sacrificed by exsanguination from the heart.

Parasites. The following strains of E. histolytica were used: HM-1, HM-3, HM-38, HK-9, and 2C-1 (cloned from the HM-1 strain by Dr. Jesús Caledrón), E. invadens, E. moshkovskii, and E. laredo. All amebas were axenically grown on TYI-S-33 medium according to Diamond et al. (1978); E. invadens, E. moshkovskii and E. laredo were kept at room temperature. For all experiments amebas were used after 72 hours of culture, at a concentration of either  $1 \times 10^6$  or  $5 \times 10^6$ /ml of 15 mM potassium phosphate buffer pH 7.5 and 184 mM NaCl (PBS-A). The use of PBS-A was necessary because TYI-S-33 medium can induce mild acute inflammation when injected into the rat testes. Prior to injection, the viability of the amebas was determined by the trypan blue exclusion test; trophozoites were used when viability was >90%.

Testicular amebiasis. A total of 91 rats were injected in the left testes with 0.5 ml of PBS-A containing  $1 \times 10^6$  axenically grown HM-1 trophozoites. The injection was made through the scrotum close to the distal pole of the left testes, avoiding the tail of the epididymis and directing the needle obliquely towards the

opposite pole of the testes, in order to deposit the amebas in the central part of the organ. The right testes was equally injected with 0.5 ml of PBS-A without amebas. A control group of 6 animals was injected intratesticular-ly on both sides with 0.5 ml of TYI-S-33 sterile medium, and 2 animals were sacrificed at 5, 24 and 48 hours, respectively. Different groups of animals (indicated between brackets) were sacrificed as described at intervals of 3(1), 5(3), 10(2), 24(18), 48(44), 72(6), 96(2), 120(1), 144(4), 192(1), 240(1), and 288(2) hours after injection. The testes were removed and sectioned transversally to their greater axis approximately every 4 mm with two sharp surgical blades moving simultaneously in opposite directions. Tissue blocks showing gross changes were fixed in 10% neutral formaldehyde, embedded in paraffin, cut at 6 $\mu$  and stained with H&E and Masson's trichrome techniques. Neighboring tissue blocks were finely minced, cultured in TYI-S-33 medium, and thoroughly examined for the presence of motile and/or adherent ameba; if no parasites were observed, the cultures were discarded after 48 hours. When no lesions were grossly detectable two different tissue blocks taken from the central part of the organ were processed for microscopic and recovery studies as mentioned above.

Leukopenic rats. Leukopenia was induced in 17 rats

by the single intravenous injection of 5-10 mg/kg of body weight of HN<sub>2</sub> (Mustargen, Merck, Sharp & Dohme, N.J.), according to Becker et al. (1988). The degree of leukopenia was 1,000 wbc/ml or less, a level usually reached 72 hours after administering HN<sub>2</sub>.

Inhibition of amebic proteinases. Axenically grown trophozoites of E. histolytica ( $1 \times 10^6$ ) strain HM-1 were washed twice with PBS-A and incubated for 30 min at 37°C with 5 mg/ml of purified human alpha-2-macroglobulin (a2M); a2M was purified from fresh human plasma (a gift of Dr. Antonio Marín) according to the method of Kurecki et al. (1979). After incubation with a2M, amebas were used for both intratesticular injection into 9 rats and for determination of residual proteinase activity (see below).

Amebic proteinases and virulence. For each parasite species and/or strain 6-10 rats were injected intratesticularly with  $1 \times 10^6$  amebas in 0.5 ml of PBS-A; the animals were sacrificed 48 hours later and the testes examined histologically at random. The necrotic lesions (average number of seminiferous tubules involved) and the intensity of the inflammation reaction (intertubular edema and polymorphonuclear leukocyte infiltration) were graded on a 0-10 scale. Proteinase activity was measured according to Becker et al. (1988). Briefly, amebic trophozoites ( $2 \times 10^5$ ) were washed three times with

PBS-A, resuspended in 0.2 ml of PBS-A and incubated in 0.4 ml of azocasein (1.25 mg/500  $\mu$ l of PBS-A for 30 minutes at 37°C. Proteolysis was stopped by addition of 600  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid at 4°C for 12 hours, followed by centrifugation of the precipitate at 5,000 g for 5 minutes at room temperature. The absorbance of the supernatant was measured at 366 nm.

Zymograms. A procedure previously described by Pérez-Montfort et al. (1987) and based on the method of Birkedal-Hansen and Taylor (1982) was carried out with some modifications. Washed trophozoites ( $1 \times 10^7$ ) were lysed by three freeze-thawing cycles or by addition of 0.5% Triton X-100 in PBS-A, in the absence of proteinase inhibitors. The lysates were then mixed with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer containing sodium dodecyl sulfate (SDS) and 9% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol (samples were not boiled) and separated by SDS-PAGE in 12.5% acrylamide gels. Immediately after electrophoresis the gel was laid on top of another gel containing 7.5% acrylamide in 0.075 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl and 0.57 mg/ml of either casein or gelatin, but no SDS. The gels were placed between glass plates, wrapped in wet tissue paper and incubated in a humid chamber at 37°C for 8-24 hours, fixed and stained in 25% (v/v) isopropanol, 10% (v/v) glacial acetic acid and 0.1% (v/v)

Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Richmond, California) for 6-20 hours at room temperature, and then destained in 10% acetic acid at room temperature.

## RESULTS

Testicular amebiasis. The first gross changes become apparent 10-24 hours after injection of amebas. The organ appears smaller, feels more resistant, does not spill upon sectioning and the cut surface is dryer. There is a poorly defined area of whitish discoloration with attenuation of the tubular structure, which may occupy a large part or even the entire cut surface of the testes (Fig. 1a). This lesion remains unchanged even 168 hours after injection. PBS-A controls show a pin-point area of whitish discoloration on the cut surface of the testes, corresponding with the needle tract, which disappears after 48 hours. Microscopically, as early as 3 hours after injection of amebas there is edema with loss of tissue structure, congestion and occasional hemorrhage in areas adjacent to parasites (Fig. 1b). Some seminiferous tubules in contact with, or very close to, amebas reveal some loosening, detachment and rounding of germ cells. Viable amebas begin to disappear 5 hours after injection, many of them surrounded by polymorphonuclear leukocytes, although they remain visible as recognizable amebic debris

for up to 10 hours (Fig. 1c). Between 5 and 10 hours after injection polymorphonuclear leukocytes become one of the predominating elements of the lesion, the affected seminiferous tubules and their corresponding intertubular tissues undergo coagulative necrosis, with progressive loss of their basophilic features and conversion into acidophilic ghosts of their previous structures. After 24 hours the lesion becomes more sharply demarcated from less severely damaged tubules and there is focal interstitial infiltration by polymorphonuclear leukocytes, usually more apparent in the periphery of the necrotic zone. Recovery of amebas in culture was usually achieved up to 5 hours after injection, and in a few instances a few amebas grew out of the tissue fragments obtained 10 hours after injection. After this time period, no amebas were recovered in culture.

Amebic testicular necrosis in leukopenic rats. Nine of the animals died before 24 hours after intratesticular injection of amebas, with only 8 surviving for various periods up to 36 hours. On gross examination, results in this experimental group were the same as with the animals previously described, i.e., the testis injected with amebas showed extensive necrosis whereas homologous controls revealed minimal lesions associated with the needle tract. Microscopically, the only difference with

the previous group was the almost complete absence of polymorphonuclear leukocytes in the lesions of the leukopenic rats.

Effect of inhibition of amebic proteinases on amebic testicular necrosis. The level of amebic proteinase inhibition repeatedly achieved after 30 min incubation of trophozoites with a2M, under the conditions described above was  $80\% \pm 0.5$ . Amebic viability was unaffected by preincubation with a2M. After 48 hours testes treated with amebas were grossly indistinguishable from sham-treated testes in consistency, cut surface features, and the gross presence of a very small (1-2 mm) area of necrosis corresponding to the needle tract. Occasionally, the area of necrosis was slightly larger (3-4 mm) in the testis injected with amebas. Histologic comparison of lesions in both testes showed a similar or slightly larger area of coagulation necrosis of seminiferous tubules with more edema and leukocyte infiltration in the testes injected with amebas.

Testicular lesions produced by eight different amebic types. Microscopically, the comparative appearance of testicular lesions 48 hours after the injection of  $1 \times 10^6$  amebas of eight different amebic types revealed variations in both the extension of the necrotic area and the magnitude of the inflammatory reaction. Table I

gives a summary of microscopic observations for each of the eight types of amebas studied, including the "grading" of lesion scores. An inoculation dose of  $5 \times 10^6$  trophozoites of strain HM-1, HK-9, 2C-1 and invadens produced lesions distinctly larger than  $1 \times 10^6$  trophozoites; the lesions caused by the laredo strain were barely distinguishable from those of sham-treated controls.

Table II shows absolute and relative proteinase activities (HM-1 = 100%) measured against azocasein in seven amebic strains of the eight amebic types included in this study. HM-1, E. invadens and HM-38 showed high proteinase activity whereas in HK-9, 2C-1, HM-3 and E. laredo it was low. This difference in the level of proteinase activity between HM-1 and the laredo strain was almost 15-fold.

Zymograms of the eight different amebic types.

E. histolytica strains (HM-1, HM-3, HM-38, 2C-1 and HK-9, lanes 1 to 5, respectively) showed very similar patterns, with variations in the relative degree of substrate lysis corresponding to the various bands (Fig. 2). On the other hand, E. invadens, E. laredo and E. moshkovskii revealed proteinase patterns different from those of E. histolytica.

DISCUSSION

The experimental model of amebic tissue damage



described in this paper is a self-limited inflammatory and necrotizing lesion produced in the rat testes by the injection of axenically grown trophozoites of a pathogenic strain of Entamoeba histolytica. The self-limited character of the process may be due to the disappearance of amebas 10 hours after injection. Tsutsumi et al. (1984, 1988) have suggested that in experimental acute amebic liver abscess in hamsters necrosis is due not to the direct effect of trophozoites on liver cells but to disintegrating polymorphonuclear leukocytes and monocytes. On the other hand, in this and another experimental model of amebiasis in the rat (Becker et al., 1988) we have found that tissue necrosis occurs in the absence of polymorphonuclear leukocytes. This difference could be explained by the different experimental conditions.

Our data also support the role of amebic proteinases as some of the molecules primarily responsible for tissue destruction in amebiasis, as claimed by others (Keene and McKerrow, 1985; Lushbaugh et al., 1985; Luaces and Barret, 1988; Schulte and Scholze, 1989; Reed et al., 1989). It is widely accepted that amebic proteinases do not cause cell death and lysis in in vitro systems (Keene et al., 1986; Luaces and Barrett, 1988); such role has been attributed to other molecular factors such as phospholipase A (Ravdin et al., 1985) or amebopore (Gitler and Mirelman,

1986). On the other hand, amebic proteinases have been shown to degrade several tissue components, such as collagen, fibronectin and laminin (Reed et al., 1989; Schulte and Scholze, 1989).

The extent of testicular lesions was correlated with the level of proteinase activity in all but one of the seven amebic strains; the exception was E. invadens, which showed high proteinase activity but caused minimal testicular damage. Nevertheless, the zymogram proteinase pattern of this amebic type was very different from the zymogram of E. histolytica strains. Therefore, it seems reasonable to suggest that both the pathogenicity and degree of virulence of various amebic strains are determined not only by their level of proteinase activity but also by the nature of their corresponding enzyme proteins.

REFERENCES

- Becker I, Pérez-Tamayo R, Montfort I, Alvizouri AM,  
Pérez Montfort I (1988) *Entamoeba histolytica*: Role  
of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes  
in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp  
Parasitol* 67:268-280
- Birkedal-Hansen H, Taylor RE (1982) Detergent-activation  
of latent collagenase and resolution of its  
component molecules. *Biochem Biophys Res Comm*  
107:1173-1178
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium  
for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*  
and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*  
72:431-432
- Gitler C, Mirelman D (1986) Factor contributing to the  
pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Ann  
Rev Microbiol* 40:237-261
- Keene WE, McKerrow JH (1985) Isolation and characteri-  
zation of the neutral thiol proteinase of virulent  
*Entamoeba histolytica*. *Fed Proc* 44:1335
- Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH (1986) The  
major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*.  
*J Exp Med* 163:536-549

- Kurecki T, Kress LF, Laskowski M (1979) Purification of human plasma  $\alpha_2$  macroglobulin and  $\alpha_1$  proteinase inhibitor using zing chelate chromatography. *Anal Biochem* 99:415-420
- Luaces AL, Barrett AJ (1988) Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of Entamoeba histolytica. *Biochem J* 250:903-909
- Lushbaugh WB, Hofbauer AF, Pittman FE (1985) Entamoeba histolytica: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol* 59:328-336
- Pérez-Montfort R, Oatua-Saloma P, Velázquez-Medina L, Montfort I, Becker I (1987) Catalytic classes of proteinases of Entamoeba histolytica. *Mol Biochem Parasitol* 26:87-98
- Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA (1985) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of Entamoeba histolytica. *J Infect Dis* 152:542-549
- Reed SL, Keene WE, McKerrow JH (1989) Thiol proteinase expression and pathogenicity of Entamoeba histolytica. *J Clin Microbiol* 27:2772-2777

Schulte W, Scholze H (1989) Action of the major protease from Entamoeba histolytica on proteins of the extracellular matrix. J Protozool 36:538-543

Tsutsumi V, Martínez Palomo A (1988) Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. Am J Pathol 130:112-119

Tsutsumi V, Mena-López R, Anaya-Velázquez F, Martínez-Palomo A (1984) Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am J Pathol 117:81-91

Table I

MICROSCOPIC FEATURES OF TESTICULAR LESIONS PRODUCED  
BY EIGHT DIFFERENT TYPES OF AMEBA

AMEBIC TYPE	SALIENT HISTOLOGICAL FEATURES	GRADING OF LESION SCORES
<u>E. histolytica</u>		
HM-1	Extensive necrosis affecting at least half the organ, with massive infiltration by polymorphonuclear leukocytes; in some instances there is irregular cavitation of the lesion.	10
HM-3	Very small lesion approximately twice the size of the control, with destruction of about 10 seminiferous tubules, mild edema and slight infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	3
HM-38	Lesion clearly larger than controls, affecting about 30-40 seminiferous tubules, with prominent edema and heavy infiltration with polymorphonuclear leukocytes; in one animal it occupied about 30 per cent of the testes.	8
2C-1	The lesion is larger than the control, occupying about 8-12 seminiferous tubules; there is no edema and minimal polymorphonuclear leukocyte infiltration.	2
HK-9	Pin-point lesion involving 4-8 seminiferous tubules, with little edema but heavy infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	2
<u>E. invadens</u>	Lesion about twice the size of controls, with some 10-15 seminiferous tubules destroyed, edema and slight infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	3
<u>E. laredo</u>	Variable but always very small lesion, with scarce edema and few polymorphonuclear leukocytes; it is not always possible to distinguish from controls.	2
<u>E. moshkovskii</u>	Very small lesions, not always possible to distinguish from the controls.	2
Control	Necrosis of 4-8 seminiferous tubules with little edema and no polymorphonuclear leukocytes	1

Table II

PROTEINASE ACTIVITIES\* OF DIFFERENT TYPES OF AMEBAS  
AND HISTOLOGIC GRADE OF LESIONS

Entamoeba spp.	ABSOLUTE ACTIVITY	RELATIVE ACTIVITY	GRADE
<u>E. histolytica</u>			
HM-1	0.176	100	10
HM-38	0.110	62	8
HM-3	0.027	15	2
2C-1	0.040	22	3
HK-9	0.060	37	3
<u>E. invadens</u>	0.145	82	2
<u>E. laredo</u>	0.012	7	2

\*Measured against azocasein

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. GROSS AND MICROSCOPIC ASPECT OF ACUTE AMEBIC TESTICULAR NECROSIS IN THE RAT

- a) Gross aspect of the cut section of control (left) and experimental (right) testis, 48 hours after injection of  $1 \times 10^6$  axenically grown trophozoites of E. histolytica strain HM-1.
- b) Photomicrograph of the testis 10 hours after injection of  $1 \times 10^6$  axenically grown trophozoites of E. histolytica strain HM-1. There is marked edema with widening of the intertubular spaces (asterisk) necrosis of tubular structures (empty arrow) and sparse focal and diffuse infiltration by polymorphonuclear leukocytes (arrowhead). 200X.
- c) Two amebas (arrows) in the intertubular space surrounded by polymorphonuclear leukocytes. Note degenerative changes in tubular cells (asterisk). 400X.

Figure 2. PROTEINASES (GELATINASE) ZYMOGRAM OF EIGHT TYPES

Lanes 1 to 5, different strains of E. histolytica:  
Lane 1, HM-1; Lane 2, HM-3; Lane 3, HM-38; Lane



4, 2C-1; Lane 5, HK-9. Lanes 6 to 8, different  
amebic types: Lane 6, E invadens; Lane 7, E.  
laredo; Lane 8, E. moshkovskii. S = Start.

F = Finish. Mr = Molecular Weight.

Table II

ABSOLUTE AND RELATIVE (TO HM-1) PROTEINASE ACTIVITY  
OF DIFFERENT TYPES OF AMEBAS\*

<u>AMEBIC TYPES</u>	<u>ABSOLUTE ACTIVITY</u>	<u>RELATIVE ACTIVITY</u>
<u>E. histolytica</u>		
HM-1	0.176	100
HM-3	0.027	1.5
HM-38	0.110	62.0
2C-1	0.04	2.2
HK-9	0.66	3.7
<u>E. invadens</u>	0.145	82.0
<u>E. laredo</u>	0.012	0.7

\*Measured against azocasein.

Table I

MICROSCOPIC FEATURES OF TESTICULAR LESIONS PRODUCED BY  
8 DIFFERENT TYPES OF AMEBA

AMEBIC TYPE	SALIENT HISTOLOGICAL FEATURES	GRADE
<u>E. histolytica</u>		
HM-1	Extensive necrosis affecting at least half the organ, with massive infiltration by polymorphonuclear leukocytes; in some instances there is irregular cavitation of the lesion.	10
HM-3	Very small lesion approximately twice the size of the control, with destruction of about 10 seminiferous tubules, mild edema and slight infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	3
HM-38	Lesion clearly larger than controls, affecting about 30-40 seminiferous tubules, with prominent edema and heavy infiltration with polymorphonuclear leukocytes; in one animal it occupied about 30 per cent of the testes.	8
2C-1	The lesion is probably larger than the control, occupying about 8-12 seminiferous tubules; there is no edema and minimal polymorphonuclear leukocyte infiltration.	2
HK-9	Pin-point lesion involving 4-8 seminiferous tubules, with little edema but heavy infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	2
<u>E. invadens</u>	Lesion about twice the size of controls, with some 10-15 seminiferous tubules destroyed, edema and slight infiltration by polymorphonuclear leukocytes.	3
<u>E. laredo</u>	Variable but always very small lesion, with scarce edema and few polymorphonuclear leukocytes; it is not always possible to distinguish from controls.	2
<u>E. moshkovskii</u>	Very small lesions, not always possible to distinguish from the controls.	2

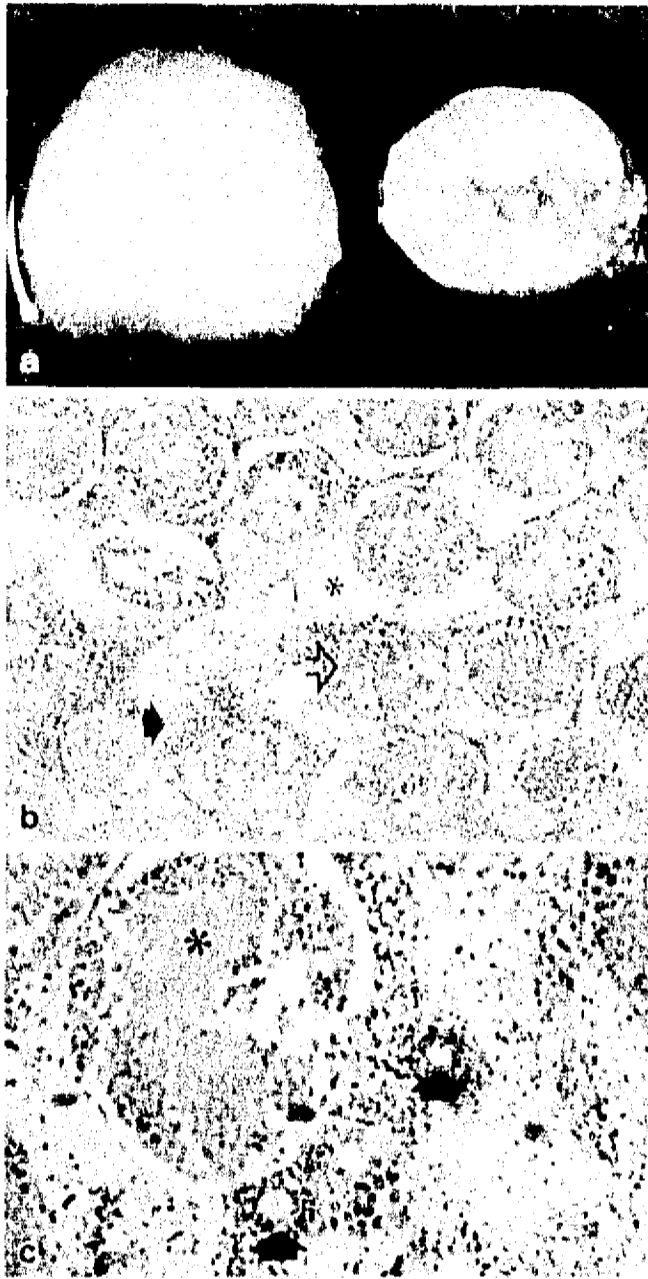


Figure 1

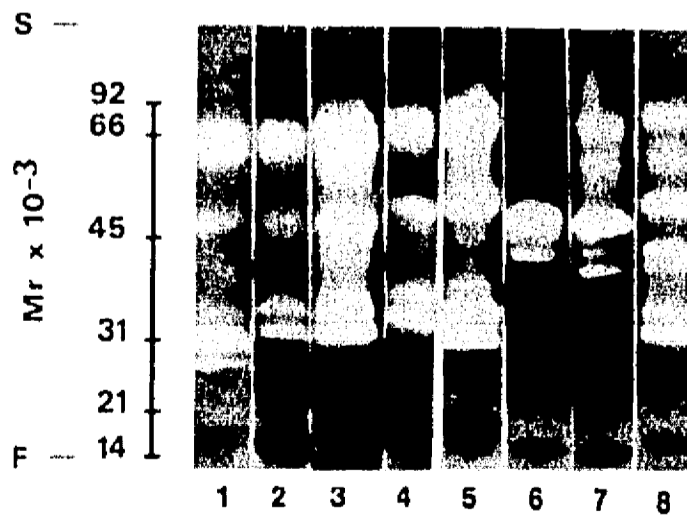


Figure 2.

## TRABAJO 2

Ostoa-Saloma, P., Cabrera, N., and  
Perez-Montfort, R., RELATIONSHIPS  
BETWEEN TWO CYSTEINE PROTEINASES  
OF *Entamoeba histolytica*. EN  
PREPARACION.

SHORT COMMUNICATION

TITLE: STRUCTURAL RELATIONSHIPS BETWEEN TWO CYSTEINE PROTEINASES  
OF Entamoeba histolytica.

AUTHORS: PEDRO OSTOA-SALOMA, NALLELY CABRERA and RUY PEREZ-  
MONTFORT

AFFILIATION: Departamento de Microbiología, Instituto de  
Fisiología Celular, U.N.A.M. Apartado Postal 70242, 04510 México  
D.F. México

Correspondence Name and Address:

Dr. Ruy Perez-Montfort  
Departamento de Microbiología  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Post 70-242  
04510 México, D.F.  
MEXICO

Entamoeba histolytica trophozoites are invasive cells capable of tissue penetration and production of intestinal ulcers and lesions in several tissues of the human host. These lesions are all characterized by extensive necrosis.(1)

Many of the proteolytic activities described in complete cells and in subcellular fractions of E. histolytica are due to cysteine proteinases (2,3,4). The precise number of cysteine proteinases isolated appears to be dependent on the technique used for purification. Two "major" neutral cysteine proteinases were recently purified from extracts of HM-1 trophozoites, and conditioned medium used for cultivation of amebas from strain HK-9 (5,6). The first had a molecular weight (MW) of 27,000 and the other one of 56,000. Both degrade connective tissue, purified fibronectin, laminin, and type I collagen, suggesting a role in extraintestinal amebiasis. They also have a similar substrate specificity for synthetic peptides with positively charged aminoacids at the P1 and P2 positions, both need reducing agents for activity, and have identical inhibition profiles (7). Furthermore, analysis of the gene coding for the HM-1 histolysin indicates that is synthesized as a proenzyme (8).

In order to establish if there is a structural relationship between these two enzymes, we have undertaken a chemical comparison using peptide mapping. We conclude that the two proteins have substantial structural similarity. The proteinases were purified from E. histolytica HM-1 IMSS using organomercurial agarose (OMA) (14) and Sepharose glutathione-2-pyridyl disulfide (S-g-2PDS) (13). Many contaminating proteins

were removed with previous ammonium sulfate precipitation (30%-50% for S-g-2PDS and 50%-70% for OMA). The proteinases isolated were labeled with iodine 125 (ICN Radiochemical, Irvine CA) and separated in SDS polyacrylamide gel electrophoresis (9,10). Peptide mapping of the labeled proteins was made using the method of Cleveland et al. (11). The substrate gel electrophoresis has been previously described (4).

The protein eluted from the S-g2PDS resin had proteolytic activity as could be shown by means of substrate gel electrophoresis (fig. 1 lane B). The zone with proteolytic activity and the most prominent labeled band eluted from the same resin had almost identical apparent molecular masses (fig. 2 lane A). The apparent molecular mass of this protein is in good agreement with that reported for "histolysin" (5) and with one of the three bands reported by Gitler et al. (12). One of the proteins eluted from the OMA resin produced a hydrolysis zone with a Mr of 56,000 (fig. 1 lane A). Again, the apparent molecular mass of this activity coincides with the Mr of the protein labeled most prominently with iodine 125, and obtained from the same resin (fig 2 lane B). This protein could be similar or identical to the proteinase isolated by Keene et al. (6). A preliminary comparison between both proteinases of *E. histolytica* was made by limited proteolysis of the iodinated proteins excised from dried gels. A one-dimensional peptide map using proteinase V-8 (fig. 3) shows the similarity of the peptides obtained with both proteinases. These data suggest that both proteinases are closely related. They may represent one single enzyme but in different aggregation/disaggregation states. At the present moment we do



not know if the experimental protocols produce those conditions  
or if this is a normal consequence of amebic metabolism.

#### Legends for Figures

Figure 1. Zymogram of a gel on which the proteins eluted from S-g2PDS (lane B) and OMA resins (lane A) were analyzed. Lane B, there are two zones of hydrolysis, one centering at an apparent molecular weight (Mr) of 26,000 and the other at 54,000. In lane A the hydrolysis zone centers around a Mr of 54,000.

Figure 2. Autorradiography of a gel in which the labeled eluted protein from S-g-2PDS (lane A) and OMA (lane B) were analyzed. Lane A shows a band with a Mr of 24,000, a minor component with a Mr of 60,000 is also labeled. Lane B shows an intense band with a Mr of 60,000, and also a faint radioactive band is apparent at the Mr value of 24,000.

Figure 3. Autorradiography of a 16% Urea-Gel on which labeled proteins of Mr 26,000 and 60,000 were analyzed by limited proteolysis. Lanes A and B show four apparently identical fragments in a Mr range between 16,000 and 30,000.

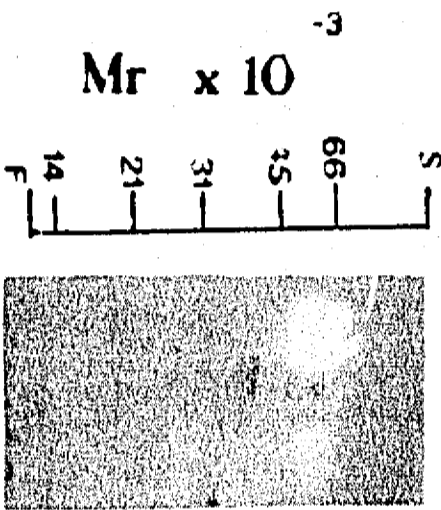


FIG. 1

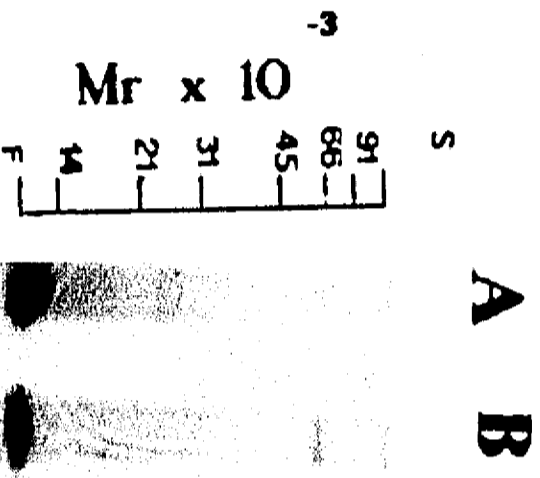


FIG. 2

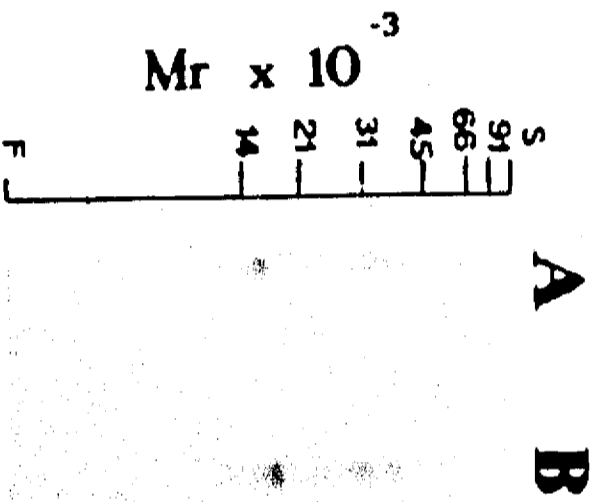


FIG. 3

#### REFERENCES

- 1.- Perez-Tamayo,R., Pathology of Amebiasis, in Amebiasis, Martinez-Palomo,A.,Ed.,Elsevier, Amsterdam, 1986, 45.
- 2.- Loushbaugh,W.B. Proteinases of Entamoeba histolytica, in Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica, Ravdin,J.I.,Ed., John Wiley & Sons, New York, 1987, 219.
- 3.- Perez-Montfort, R., Ostoa-Saloma,P., Velazquez-Medina,L., Montfort,I, Becker,I., 1987.Mol.Biochem.Parasitol. 26: 87
- 4.- Ostoa-Saloma,P. Cabrera,N., Becker,I., and Perez-Montfort,R. 1989. Mol.Biochem.Parasitol. 32: 133.
- 5.- Luaces,L., and Barrett,A.J. 1988. Biochem. J. 250: 903.
- 6.- Keene, W.E., Petitt,M.G., Allen,S., and McKerrow,J.H., 1986. J.Exp.Med. 163: 536
- 7.- Keene,W.E., Hidalgo,M.E., Orozco,E., and McKerrow,J.M., 1990. Exp. Parasitol. 71: 199.
- 8.- Bouvier,J., Sikes,A., Keene,W.E., Reed,S., and McKerrow,J.H., 1989. The thiol proteinase of Entamoeba histolytica: cloning of the gene and review of its role as a virulence factor. In: XI Seminario sobre Amibiasis. del 15 al 17 de Noviembre. México, D.F.
- 9.- Ames,G.F.-L., 1974. J. Biol. Chem. 249: 634.
- 10.- Schägger,H., and von Jagow,G. 1987. Anal. Biochem. 166: 368.
- 11.- Cleveland,D.W. 1983. Methods in Enzymology. Vol.96: 222.
- 12.- Gitler, C. and Mirelman,D. 1986. Ann.Rev.Microbiol. 40: 237
- 13.- Brocklehurst,K., Carlsson,J., Marek,P., Kierstan,J. and Crook,M.E. 1974. Methods in Enzymology. Vol. 34: 531
- 14.- Sluyterman,L.A. and Wijdenes,J. 1974. Methods in Enzymology Vol. 34: 545.

# CAPITULO II

## *PROTEASAS Y SU MEDICION*

## INTRODUCCION

Desde hace aproximadamente un siglo, las enzimas que tienen un papel central en la degradación de las proteínas, por hidrólisis del enlace peptídico, son conocidas como proteasas.

El término se originó en los laboratorios alemanes de química fisiológica en 1890 cuando estudiando la composición química de los tejidos, los investigadores se dieron cuenta de cambios en la composición del tejido después de su almacenamiento, aún cuando la intervención de las bacterias era prevenida por la presencia de cloroformo o tolueno. Salkowsky, (1890) describió los cambios químicos que ocurrían en el hígado, músculo y glándula adrenal incubados por largos periodos de tiempo a 37°C y sugirió que eran debidos a actividad enzimática. Este punto, sobre la naturaleza de los productos de autodigestión, fue probado posteriormente en el laboratorio de Salkowsky (1).

Esencialmente, las proteinasas funcionan para crear moléculas biológicamente activas o para destruir proteínas y péptidos biológicamente activos. Estas dos funciones generales no necesariamente implican la multitud de procesos en los cuales las proteinasas participan; estos procesos incluyen reorganización del citoesqueleto, fusión y diferenciación celular, memoria, síntesis de proteínas, activación e inactivación de hormonas, fecundación, crecimiento, envejecimiento, defensa inmunológica, degradación de material endocitado, necrosis, coagulación de la sangre y producción de productos vasoactivos (2,3).

a) Nomenclatura.

Las proteasas forman un grupo de enzimas cuya nomenclatura es complicada ; esto es debido fundamentalmente al hecho de que las proteasas exhiben una especificidad de sustrato. Esta especificidad sirve de base a una clasificación. Aunque la reacción química que se cataliza es esencialmente la misma, las diferentes proteasas tienen diferentes preferencias debido a la presencia de otros grupos que rodean al enlace peptídico a hidrolizar, por ejemplo, algunas proteasas tienen preferencia por el grupo carboxilo terminal o por el grupo amino terminal de la cadena polipeptídica (exopeptidasas), otras proteasas actúan en el interior de dichas cadenas (endopeptidasas) y , en este caso, la especificidad es dependiente de la cadena lateral del aminoácido encontrado en la vecindad del enlace peptídico a atacar.

Otro criterio de clasificación está basado en función del mecanismo que la proteasa tiene para actuar. Sobre esta base tenemos proteasas de serina, proteasas de cisteína, proteasas de aspártico y metaloproteasas. El criterio de especificidad, que divide a estas enzimas en exo y endopeptidasas, tiene prioridad sobre el criterio con base en el mecanismo y sobre la clasificación propuesta por la Unión Internacional de Bioquímica (UIB)(4).

De acuerdo con la Nomenclatura Enzimática de la UIB, las proteasas son designadas por un código de números, de tal manera que el primero el segundo y el tercero se refieren a la clase, subclase y sub-subclase respectivamente. Las proteasas (péptido-

hidrolasas: 3.4) son una subclase perteneciente a las hidrolasas (clase 3) y son divididas en dos sub-subclases: peptidasas (exopeptidasas: 3.4.11-19) y proteinasas (enzimas proteolíticas, endopeptidasas, hidrólisis peptidil peptídica: 3.4.21-24). Las exopeptidasas son una sub-subclase en donde se incluyen las enzimas que hidrolizan un solo aminoácido a partir del extremo amino terminal (3.4.11); enzimas que hidrolizan un sólo residuo a partir del extremo carboxilo terminal (3.4.16-18); enzimas específicas para dipéptidos y enzimas que cortan a la cadena, a partir del amino terminal, en unidades dipeptídicas (3.4.14) o lo hacen a partir del carboxilo terminal (3.4.15). Una categoría aparte (omega peptidasas: 3.4.19) incluye enzimas que eliminan residuos amino y carboxilo terminales.

Las endopeptidasas se dividen en proteinasas de serina (3.4.21) que presentan en su sitio catalítico residuos de serina e histidina; proteinasas de cisteína (3.4.22) que presentan en sus sitio catalítico residuos de cisteína e histidina ; proteinasas de aspártico (3.4.23) que involucran a dos residuos ácidos en su proceso catalítico y metaloproteinasas (3.4.24) que utilizan un ión metálico y un residuo de ácido glutámico en el mecanismo de acción. Existe el código número 3.4.99 que se usa para las proteinasas de clase catalítica desconocida.

Hasta este momento se ha empleado el término de proteasa y después el de proteinasa; ambos términos son sinónimos e implican la capacidad de hidrolizar proteínas, sin embargo, tienen una utilidad distinta. El término proteasa se utiliza para todas las proteínas que actúan sobre el enlace peptídico mientras que el



término proteinasa se refiere exclusivamente a las endopeptidasas. Esta clasificación no considera a las proteasas que tienen actividad de endo y exopeptidasas y por lo tanto representan peptidasas que actúan sobre el enlace peptídico independientemente de la posición del enlace. Este es el principal problema asociado a esta clasificación. Cuando se estableció la clasificación con base en la especificidad, los 4 mecanismos básicos de acción no eran bien conocidos; actualmente el mecanismo de acción puede ser establecido para la mayoría de las proteasas, por lo tanto, la clasificación mecanística - incluida dentro de la Nomenclatura Enzimática para proteasas - cobra un mayor significado. Además cada grupo mecanístico puede ser dividido en familias que incluye a enzimas evolutivamente relacionadas (5).

b) Mecanismo de acción de las proteinasas.

La interacción entre la proteasa y la proteína se puede dar a través de varios residuos de aminoácidos. Para designar a los residuos que participan en la ruptura del enlace peptídico se utiliza la notación propuesta por Schechter and Berger (6) que está representada en la figura 1. Los aminoácidos que van del sitio de corte (flecha) hacia el amino terminal son denotados como P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, ..., P<sub>n</sub> (Porción del grupo acilo) , y aquellos que se extienden del sitio de corte hacia el carboxilo terminal son denominados P<sub>1</sub>' , P<sub>2</sub>' , ..., P<sub>n</sub>' (porción del grupo saliente o amino).

Los sitios de enlace sobre la proteasa son llamados  $S_1, S_2, \dots, S_n$  y  $S_1', S_2', \dots, S_n'$ , respectivamente.

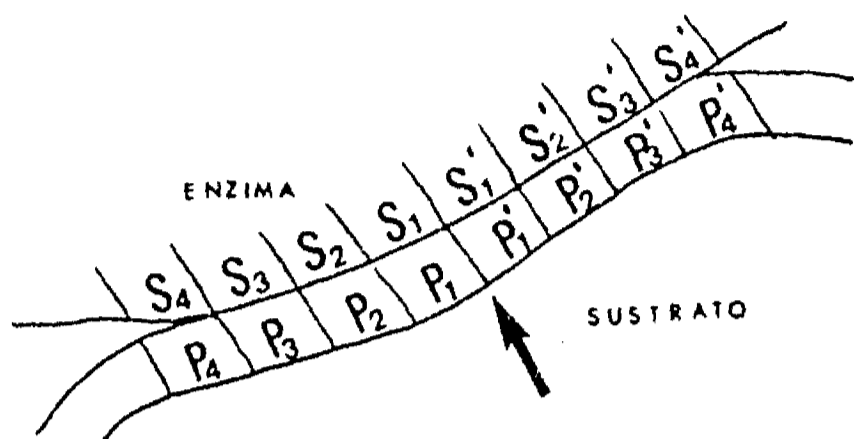


Fig 1

Proteinasas de Serina y Cisteína - La figura 2 muestra las características básicas del mecanismo de acción de la quimotripsina y papaina. Primero ocurre un ataque nucleofílico por el oxígeno del grupo hidroxilo de la serina o tiolato de la cisteína sobre el átomo de carbono del grupo carbonilo del sustrato. Este proceso, que lleva a la formación de un intermediario tetraédrico, es favorecido por un residuo de histidina que actúa como base al formar un puente con el protón del grupo hidroxilo o del tiolato que queda libre. Segundo, la ruptura del intermediario tetraédrico por la transferencia del protón, capturado por el imidazol en el paso anterior, al grupo amino del sustrato que se convierte en grupo saliente al protonarse; con esta etapa se acila la serina o la cisteína del sitio activo de la proteasa. El siguiente paso, por lo tanto, es un proceso de desacilación; este se lleva a cabo mediante los

mismos pasos que la acilación con la diferencia de que en la desacilación el nucleófilo es el agua que aumenta su nucleofilicidad con la ayuda del grupo imidazol (5,7,8)

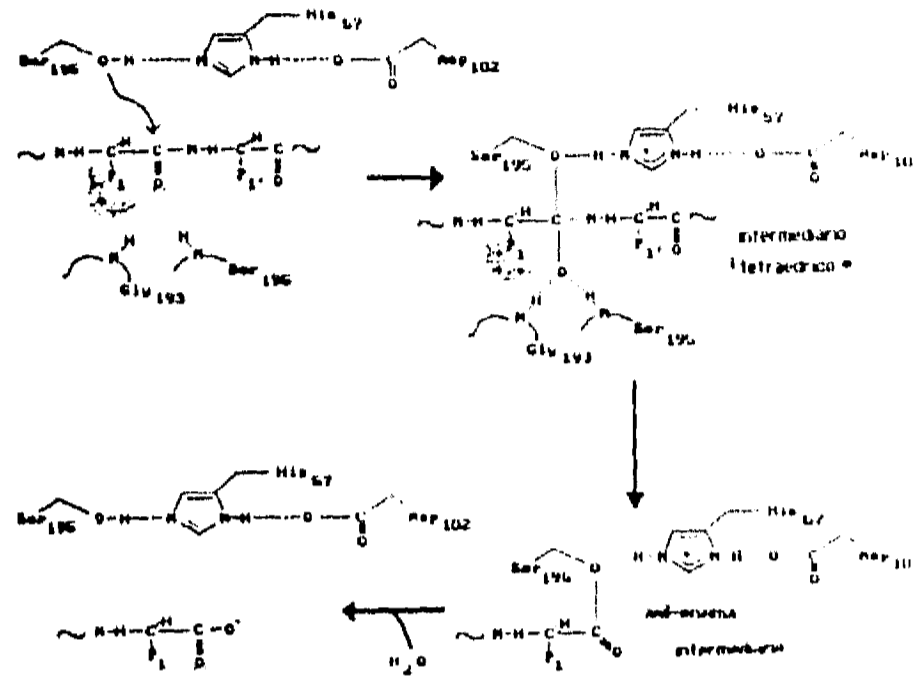


figura 2

Las diferencias entre la catálisis de las proteinasas de serina y cisteína son las siguientes:

- 1) Existe una separación de carga, en las proteasas de cisteína, entre el tiolato (carga neta negativa) y el imidazol (carga neta positiva) que no sucede en las proteinasas de serina. Esto es debido a las diferencias en las propiedades químicas de el oxígeno y el azufre. El grupo tiol es más ácido que los grupos hidroxilo por lo tanto los valores de pKa del nucleófilo e histidina son mucho más cercanos en las proteinasas de cisteína que en las de serina, lo que facilita un par iónico tiolato-imidazolio
- 2) La estabilización del intermediario tetrahédrico a través de

puentes de hidrógeno que se establecen entre el oxianión (oxígeno del grupo carbonilo del sustrato) y grupos amino de residuos cercanos al sitio activo de las proteinasas de serina y que tiene poco significado en las de cisteína.

3) El sistema estabilizador de carga que involucra a un residuo aspartato, que interacciona con el imidazol de la histidina, es esencial para la catálisis en las proteinasas de serina, dado que, como ya se dijo, en las proteinasas de serina no existe una separación de carga como en las de cisteína. Este sistema de estabilización no existe, por lo tanto, en las proteinasas de cisteína (5,9).

Proteinasas de Aspártico.- Numerosos mecanismos han sido propuestos para la acción de las proteinasas de aspártico. El mecanismo más aceptado involucra una interacción no covalente entre la enzima y el sustrato, es decir no hay un intermediario con un grupo acilo como en las proteinasas de serina y cisteína. Utilizando a la pepsina como modelo se sabe que los residuos Asp 32 y Asp 215 son los que participan en la catálisis. La característica básica del mecanismo propuesto involucra dos transferencias de protones concertadas para el enlace (formación del intermediario tetrahédrico) y para la ruptura (descomposición del intermediario). La transferencia de protones se muestra en la figura 3. En la formación del intermediario, el protón del nucleófilo (agua) es aceptado por el ión carboxilato de la enzima (Asp 32) mientras que un protón (del Asp 215 protonado) es donado al oxígeno del grupo carbonilo del sustrato. A esto se le llama una catálisis ácido-base de "estira y afloja". La ruptura del intermediario se da por el mismo mecanismo; el protón del

oxianión protonado es transferido al Asp 32 mientras que el Asp 215 protona al grupo saliente (amino). Cabe mencionar que este último protón procede del nucleófilo y llega al Asp 215 via el Asp 32. (5,10)

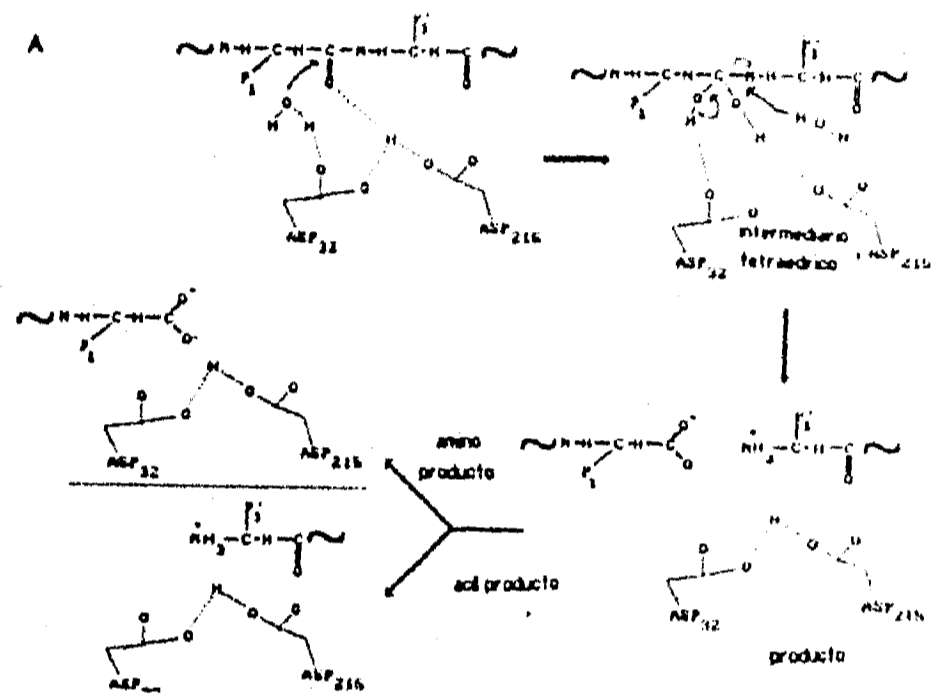


Fig 3.

Metaloproteinasas.- En la figura 4 se muestra el posible mecanismo que explica la catálisis de las metaloproteinasas. El complejo no involucra una coordinación directa entre el sitio de corte y el ión metálico sino que éste enlaza a una molécula de agua y ataca el carbono del grupo carbonilo, este proceso es promovido por la catálisis ácido-base de un residuo Glu; al mismo tiempo el oxígeno del carbonilo enlaza con el ión metálico conformando el intermediario tetraédrico. La ruptura del intermediario se da por la transferencia de un protón por parte del residuo Glu hacia el grupo saliente (amino) (5,11)

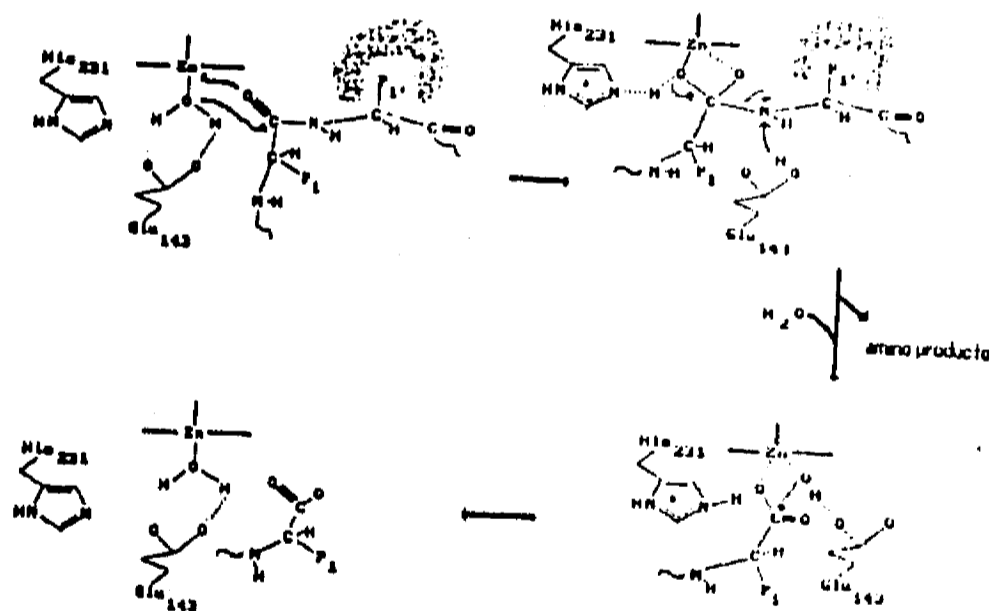


Fig. 4

c) Métodos para medir proteólisis.

La compleja especificidad de las proteasas se correlaciona directamente con la diversidad de sustratos y métodos que han sido desarrollados para su medición. Los ensayos que empleaban proteínas como sustratos para detectar proteólisis general, sin especificidad, fueron los primeros usados para medir actividad proteolítica. En general, el análisis involucra la incubación de una proteína, de preferencia desnaturalizada, con una enzima bajo condiciones definidas de temperatura, pH etc. La cuantificación depende de una separación y la medición de los péptidos derivados. Una modificación de este sistema es el desarrollo de derivados cromogénicos de proteínas (azocaseína, azoalbúmina) en el que los péptidos solubles pueden medirse por la presencia de color a través de un colorímetro (3)

Los sustratos sintéticos son aminoácidos que tienen acoplado en su grupo  $\alpha$ -COOH una amina cromogénica. Estos sustratos pueden ser clasificados en tres categorías: sustratos para endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Los sustratos para endopeptidasas no tienen ningún amino libre o carboxilo terminal mientras que los sustratos para aminopeptidasas tienen un amino terminal libre y los sustratos para carboxipeptidasas tienen un carboxilo libre (12)

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) puede ser utilizada para analizar los productos de la hidrólisis de péptidos o proteínas con una alta sensibilidad y ofrece la posibilidad de coleccionar los productos de digestión para hacer análisis de

aminoácidos (13). Algunas de las desventajas que este sistema presenta son: el alto costo del equipo, el que sólo una muestra pueda ser analizada a la vez, el que las columnas analíticas tienen que ser remplazadas a intervalos regulares.

Los sustratos que contienen péptidos radioactivos se utilizan cuando la concentración de enzima es baja y se requiere de una alta sensibilidad. Sin embargo como en la mayoría de los estudios radiométricos los reactivos son de alto costo, el material requiere especial manipulación y sus propias condiciones de desecho (3).

Existen también los llamados métodos de fase sólida para medir actividad proteolítica, en el que la enzima o el sustrato se inmovilizan. Los ensayos de este tipo caen en dos categorías: aquellos en los que la actividad se determina directamente en el gel después de una electroforesis, y aquellos en los cuales la actividad proteolítica se detecta por la transferencia de una muestra, separada electroforéticamente, hacia otro gel que contiene el sustrato y en el cual se manifiesta la actividad. A esta última categoría pertenecen los llamados zimogramas. En el caso de zimogramas para proteasas, el sustrato es generalmente gelatina que esta copolimerizada con acrilamida formando un gel con sustrato. Al gel con sustrato se le superpone otro gel de poliacrilamida que lleva la muestra, separada por electroforesis. Se incuban ambos geles a temperatura óptima. Al final, el gel con sustrato se tinte con azul de Coomassie. Al desteñirse, se identifican las zonas de hidrólisis como zonas blancas sobre un fondo obscuro.



d) Métodos fluorométricos para medir proteólisis.

Una de las propiedades fundamentales de la materia es la fuerza ejercida por un cuerpo cargado sobre otro. La fuerza que un conjunto de cargas ejercerá sobre otro conjunto que se encuentre en sus proximidades puede describirse como un campo de fuerzas. Cuando se habla de la luz, se puede describir este campo de fuerzas rodeando una configuración muy particular de cargas: un dipolo eléctrico oscilante. Un dipolo es un par de partículas cargadas (una positiva y otra negativa) separadas por una distancia muy pequeña. Si dos cargas oscilan a lo largo de la línea que las une de tal modo que la distancia de separación es una función sinusoidal, se generará una onda móvil que describirá aproximadamente una senoide moviéndose en el sentido de alejarse del dipolo a la velocidad de la luz. Este campo de fuerza móvil, generado por un dipolo oscilante, es un ejemplo de onda electromagnética y una descripción de la luz y de todos los demás tipos de radiaciones. Estas radiaciones se denominan dependiendo de la frecuencia de oscilación del dipolo que las genera. Si la frecuencia está comprendida entre  $.4 \times 10^{14}$  y  $.75 \times 10^{14}$  ciclos por segundo se le denomina luz visible; a frecuencias más altas se les denomina radiaciones ultravioleta, rayos X y rayos gamma; a frecuencias más bajas tenemos las radiaciones infrarrojas, las microondas y las ondas de radio. Existe una relación entre la velocidad ( $v$ ), la frecuencia ( $f$ ) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) de una onda:  $\lambda f = v$ . Esta ecuación nos

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

indica que si la velocidad cambia, cambiarán también tanto la longitud de onda como la frecuencia, sin embargo como la frecuencia de una onda electromagnética es la del dipolo que oscila independientemente del medio, entonces es la longitud de onda lo que normalmente cambia con el cambio de velocidad (17).

En 1900 Max K.E.L. Planck (1858-1947) había trabajado la teoría cuántica para explicar el modo en que las longitudes de onda estaban distribuidas en la radiación de un cuerpo caliente. Ninguna ecuación basada en la noción de energía como sustancia continua daba resultado, así que Planck supuso que aquella energía venía en haces discretos que él llamó "cuantos". La energía no podía abandonar el cuerpo caliente en cantidades más pequeñas que los "cuantos", pero el tamaño de los "cuantos" variaba según la longitud de onda. Cuando la longitud de onda disminuía, el tamaño de los "cuantos" se volvía proporcionalmente mayor. De aquí se deriva la ecuación:  $E = hf$ , donde E es la energía de un "cuanto", f es la frecuencia y h es la constante de Planck ( $6.6 \times 10^{-27}$  erg seg).

Un átomo que absorbe un "cuanto" de luz, cambia en dos formas correlacionadas: la energía del átomo aumenta en una cantidad hf y ocurre también una redistribución de la carga eléctrica del átomo; en el caso de aumentar la energía, se absorbe un "cuanto" de la radiación inductora. En el otro caso, cuando se emite un "cuanto" de energía, se absorbe un "cuanto" de radiación inductora y este "cuanto" se reemite forzando la emisión simultánea de un segundo "cuanto" de energía. Estas consideraciones se aplican igualmente a las moléculas complejas,

pero los estados electrónicos de las moléculas serán más variados. En el caso de los átomos el fenómeno puede describirse casi completamente especificando los orbitales de los electrones exteriores y el de menor energía es el estado electrónico fundamental. En el caso de las moléculas se deben considerar los movimientos de rotación y vibración de los núcleos, además los electrones de átomos distintos pueden unirse de tal modo que interaccionen los unos con los otros conformando un sistema mucho mayor. Los estados electrónicos de una molécula pueden describirse en términos de orbitales moleculares, análogamente a los orbitales atómicos, superponiendo los estados electrónicos de los átomos sencillos de tal manera que los electrones originalmente asociados con los átomos aislados son ahora propiedad común de ambos, formandose un enlace covalente. Estos orbitales tendrán dos estados energéticos: de alta energía y baja energía. Normalmente los electrones de enlace se encuentran en el estado de baja energía. Cuanto más extenso sea el sistema, más numerosos y menos espaciados en energía estarán los orbitales de baja y alta energía. Esto permitirá que se den transiciones con una variación muy pequeña de energía y en consecuencia, para una transición, se necesitarán "cuantos" de luz de bajas frecuencias o grandes longitudes de onda. En la figura 5 se representa un ciclo de absorción de luz y su correspondiente emisión o fluorescencia. En primer lugar se absorbe un "cuanto" de energía en una transición hacia niveles de mayor energía; se presenta entonces la oportunidad para que la molécula intercambie energía con sus alrededores en una sucesión de pequeñas transiciones entre los distintos subniveles, antes de la verdadera transición

hacia el nivel inferior. Después de la emisión aparece otra forma de intercambio energético de modo que la molécula pasa a uno de los subestados de menor energía del estado fundamental. Esta otra forma de intercambio energético es lo que causa la fluorescencia (17).

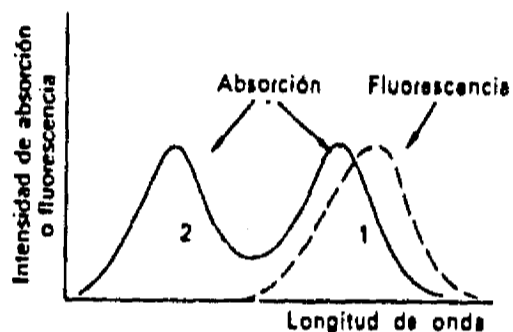
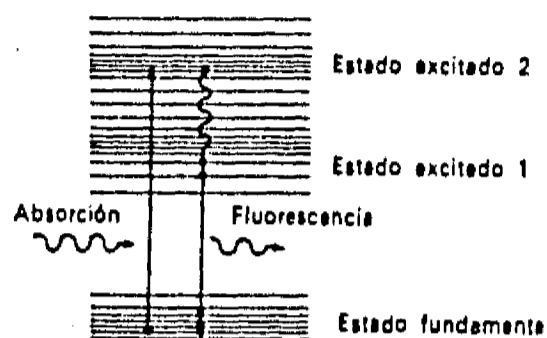


Figura 5 (Tomado de Clayton, 1973)

La fluorescencia de las proteínas se origina por la presencia de la fenilalanina, tirosina y triptofano; las propiedades de emisión y absorción se resumen en la tabla 1.

Aminoácido	Absorbancia		Fluorescencia		Sensibilidad
	$\lambda$ max (nm)	$\epsilon$ max ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\lambda$ max nm	$\phi$ F	$\epsilon$ max $\cdot \phi$ F
Triptofano	280	5600	348	0.20	1100
Tirosina	274	1400	303	0.14	200
Fenilalanina	257	200	282	0.04	8

Ø F. Rendimiento cuántico fluorescente  
Las mediciones estan hechas a PH neutro  
Tabla 1

En las proteínas que tienen los tres aminoácidos la mayor parte de la fluorescencia se debe principalmente a la contribución de los residuos de triptofano, dado que su absorbencia a la longitud de onda de excitación y su producción cuántica de emisión son considerablemente mayores que los de tirosina y fenilalanina. Los cambios en la conformación de la proteína provocan grandes cambios en la emisión de fluorescencia; cuando no hay triptofano los cambios se manifiestan por variaciones en la intensidad de la señal de la tirosina. La emisión de un triptofano en una proteína nativa puede ser mayor o más pequeña que la emisión del triptofano libre en solución acuosa; el máximo de emisión cambia de longitudes de onda más cortas, a alrededor de 350 nm que corresponde al máximo de emisión del triptofano en solución acuosa. La emisión de tirosina y triptofano se observa cuando la fluorescencia de la proteína se excita a 280 nm. La fluorescencia del triptofano se puede investigar por la excitación a longitudes de onda mayores a 295 nm. La fluorescencia de un residuo aromático expuesto depende de las condiciones polares del disolvente aún cuando no se den cambios conformacionales; este efecto se puede usar para probar la accesibilidad del disolvente a los residuos aromáticos de una proteína nativa (14).

Los pruebas fluorométricas emplean la fluorescencia inherente de sus aminoácidos o las propiedades fluorescentes de sus productos. Prácticamente todos los métodos fluorométricos

utilizan sustratos sintéticos, estos sustratos contienen el fluoróforo apagado por otro grupo presente en la molécula del sustrato pero separado del fluoróforo por el enlace peptídico a romperse, en otras palabras, el fluoróforo esta en la posición P y el grupo "apagador" de la fluorescencia del fluoróforo, en la posición P'. Se considera una ventaja en estos sustratos el que la ruptura se da entre dos aminoácidos, lo que representa una ruptura natural de enlace peptídico (15). Sin embargo, los ensayos fluorométricos no permiten el uso de extractos crudos o semipurificados por la posibilidad de apagamiento de la fluorescencia por alguno de los componentes del extracto; y dado que son sustratos muy específicos, se requiere un cierto grado de conocimiento de las características catalíticas de la proteinasa para poderlos utilizar. Se ha desarrollado un método fluorométrico en el que estas dos desventajas no existen y además ofrece un sistema de registro rápido y continuo de la actividad proteolítica con una alta sensibilidad (16). El método utiliza caseína como sustrato, esta proteína al excitarse a 300 nm presenta un espectro de emisión que se observa en la figura 6.

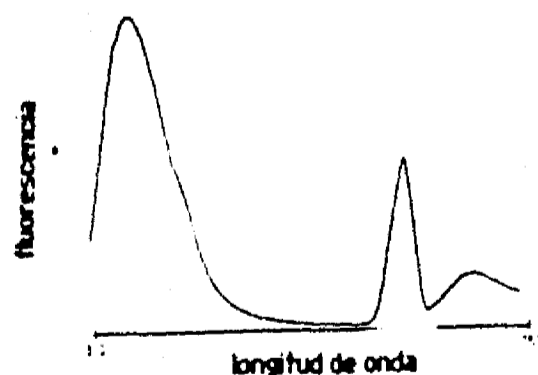


Figura 6

Se sugiere que el pico que se observa a 350 nm se debe al triptofano; este pico sufre un descenso en la intensidad de emisión de fluorescencia con la adición de una proteínasa. El hecho de que el descenso en la fluorescencia esta asociado con la digestión de la proteína se apoya por el experimento mostrado en la figura 7.

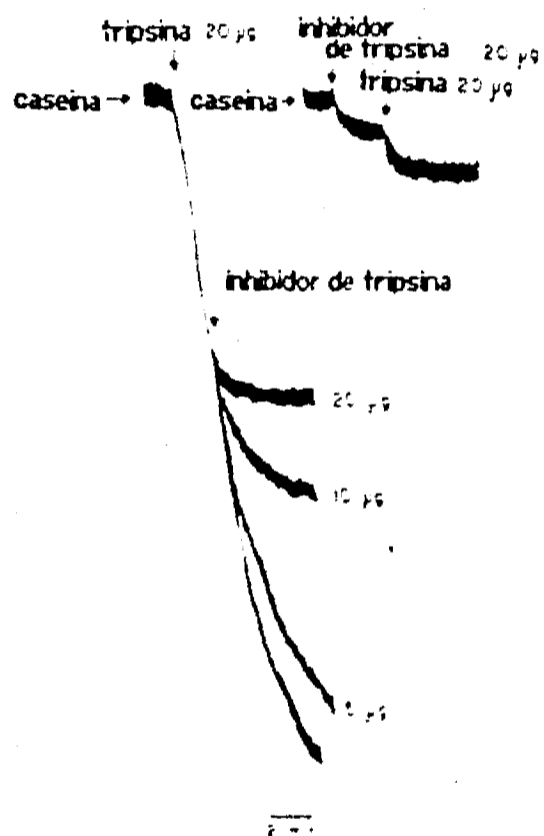


Figura 7

Inmediatamente después de añadir la tripsina, la fluorescencia comienza a descender; este descenso se detiene al agregar inhibidor de tripsina de frijol de soya y el apagamiento es proporcional a la cantidad de inhibidor. Además, si el inhibidor se agrega antes de agregar la proteinasa, prácticamente no se observa ningún apagamiento de la fluorescencia. Como se puede obtener un trazo continuo de la reacción, es posible hacer estimaciones cuantitativas como las que se muestran en la figura 8 en donde se utilizaron proteinasas de distintas clases, ensayadas a sus pHs óptimos (otra ventaja del método), y se establecieron correlaciones lineales entre la velocidad del apagamiento y la concentración de la proteinasa ensayada.

Al hacer las estimaciones cuantitativas es muy importante aclarar que por tratarse de un sustrato protéico la velocidad inicial por este sistema de medida no tiene un significado cinético y por lo tanto los parámetros que dependen de la velocidad inicial, como  $K_m$  y  $V_{max}$ , no son interpretables. Esto es debido a que las proteínas y péptidos son conjuntos de sustratos para las proteasas y no un solo sustrato. Esta problemática puede resolverse si la proteasa rompe en un solo sitio, de esta manera sabiendo la concentración de proteína, automáticamente se sabe la concentración de sustrato, pero una proteína no tiene un sólo enlace peptídico de ruptura para una determinada proteasa sino que tiene varios y muchas veces por la estructura terciaria de la proteína estos sitios no están accesibles al corte ¿como



saber entonces la cantidad de cortes que hubo y con base en esto

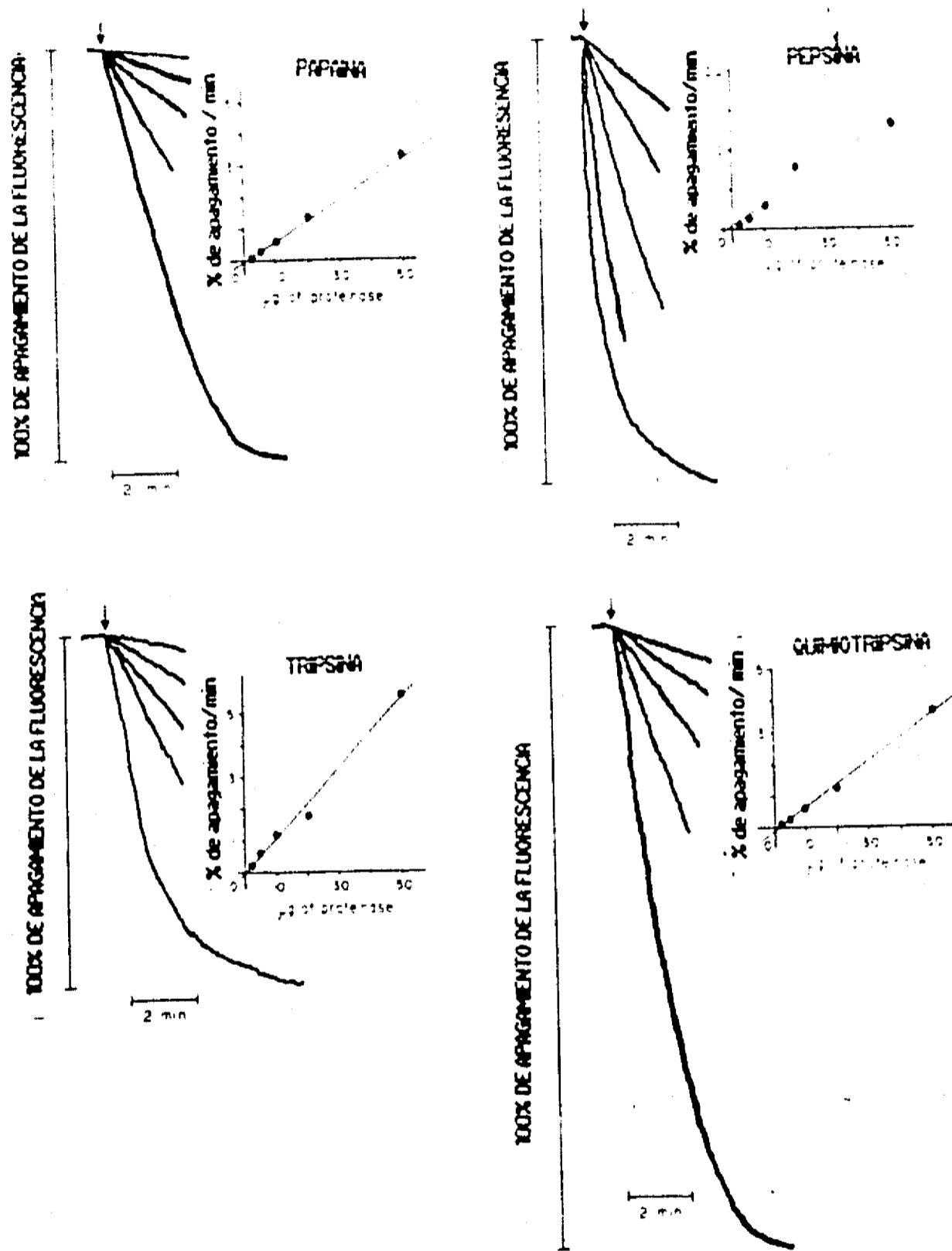


Figura 8

determinar la concentración de sustrato? el determinar esto para cada proteasa puede ser muy laborioso aunque es posible hacerlo. Sin embargo se trata de facilitar las cosas. ¿No será posible tener un sustrato con las propiedades fluorescentes de la caseína y con la posibilidad de tener sitios únicos de corte para las diferentes proteasas? ¿un sustrato natural que permitiera hacer mediciones rápidas, continuas de una alta sensibilidad y del cual se puedan obtener datos cinéticos?

Creemos que existe esa posibilidad, que la caseína es un sustrato que tiene una propiedad estructural única al disminuir su fluorescencia con la proteólisis y que es necesario estudiar esa característica estructural para poder desarrollar un sustrato con las cualidades que ya se mencionaron anteriormente.

El estudio de las causas por las que la caseína apaga su fluorescencia durante la proteólisis es el objetivo de este tercer trabajo.

## TRABAJO 3

Ostoa-Saloma, P., Ramirez, J., and  
Perez-Montfort, R., 1990. CAUSES OF THE  
DECREASE IN FLUORESCENCE DUE TO  
PROTEOLYSIS OF  $\alpha$ -CASEIN.  
Biochim.Biophys.Acta. 1041: 146.

BBAPRO 33770

## Causes of the decrease in fluorescence due to proteolysis of $\alpha$ -casein

Pedro Ostoa-Saloma, Jorge Ramirez and Ruy Perez-Montfort

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (México)

(Received 5 March 1990)

(Revised manuscript received 12 June 1990)

Key words:  $\alpha$ -Casein; Fluorescence; Proteolytic digestion; Tryptophan

Fluorescence decrease in casein solutions induced by proteolytic enzymes is mainly due to cleavage of  $\alpha$ -casein, and in particular to  $\alpha$ S1-casein, which is quantitatively the main component of commercial casein. Treatment of  $\alpha$ -casein with *o*-iodosobenzoic acid, diminished its intrinsic fluorescence considerably and abolished the decrease in fluorescence induced by proteolytic cleavage. The carboxyterminal Trp at position 199 in  $\alpha$ S1-casein contributes approximately 30% to the overall effect, while the Trp at position 164 contributes about 70%. Treatment of  $\alpha$ -casein with cyanogen bromide lowered the initial fluorescence of the preparation, but, in the resulting fragment, trypsin still diminished some of the residual fluorescence. The velocity of decrease in fluorescence correlates with the distance from the Trp in position 164 at which the peptide bond is broken. This effect seems to be rather unique for the caseins, but particularly for  $\alpha$ S1-casein; this is due to the existence of a Trp that is in the vicinity of hydrophobic amino acids and which upon hydrolysis, becomes exposed to a more hydrophilic environment.

### Introduction

Assays of proteolytic activity are used in many areas of research and industry and to some extent in clinical chemistry. Recently, a method for the measurement of casein digestion, following the fluorescence emission at 350 nm of the substrate was developed [1]. The method has a high sensitivity and functions with a wide variety of proteinases.

We have continued our study of this reaction with the individual components of commercial casein, namely  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein. The results indicate that the particular environment of Trp in the sequences of the caseins is crucial to the decrease in fluorescence that is observed during casein digestion. Other proteins with a variable number of Trp do not exhibit a similar behavior; the results also indicate that the caseins, and in particular  $\alpha$ -casein, has an apparently unique amino acid sequence-structure relationship whose cleavage accounts for the observed reduction in fluorescence.

Abbreviations: SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; IBA, *o*-iodosobenzoic acid;  $M_r$ , relative mass; BrCN, cyanogen bromide.

Correspondence: R. Perez-Montfort, Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 70-242, 04510 México D.F., México.

The contribution to the decrease in fluorescence of the two Trps in  $\alpha$ S1-casein has been determined. From the data it is apparent that Trp-164 contributes to a large extent to the lowering of fluorescence. The reason that caseins, and not other proteins, exhibit a decrease in fluorescence upon proteolysis is discussed.

### Materials and Methods

#### Caseins and other proteins

Casein from bovine milk was obtained from Sigma (St. Louis, MO) or from Pfannstiehl Laboratories (Waukegan, IL) and dissolved as described [1]. Purified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins, bovine serum albumin and lysozyme were also obtained from Sigma and were usually dissolved at a concentration of 0.5 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4). A peptide that contained 14 amino acids starting from the carboxyterminal end of cytochrome *b* from bovine heart mitochondria was a gift from Dr. Diego González-Halphen (Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., México). Protein was determined according to Lowry et al. [2] or to Smith et al. [3].

#### Proteinases

Carboxypeptidase Y, trypsin, bromelain, ficin, papain, pepsin, pancreatic elastase, kallikrein, plasmin,

thrombin, cathepsin B, proteinases from *Streptomyces griseus* type XIV (pronase), *Bacillus licheniformis* type VIII (subtilisin Carlsberg), *Bacillus thermoproteolyticus rokko* type X (thermolysin), *Staphylococcus aureus* strain V8 and *Streptomyces griseus* types X, XVII and XXI (active at pH 11.0) were obtained from Sigma. Aminopeptidase M from hog kidney, endoproteinase Arg-C from mouse submaxillary gland and endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* were obtained from Boehringer-Mannheim. All proteinases were dissolved at the desired concentration (usually 1 mg/ml) as described previously [1]. The assay buffers of bromelain, cathepsin B and papain contained 2 mM cysteine. Endoproteinase Arg-C was assayed in borate-buffered saline (200 mM boric acid and 160 mM sodium chloride, pH 8.0). Endoproteinase Lys-C and kallikrein were assayed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), endoproteinase Glu-C (proteinase V8) was assayed in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 7.8) and the proteinase from *Streptomyces griseus* type XXI was assayed in 50 mM carbonate buffer (pH 11.0).

#### Fluorometric measurements

All fluorometric measurements were made using a spectrofluorometer model SMC 2190 from SLM Instruments, (Urbana-Champaign, IL) with a magnetic stirrer, connected to a chart recorder, Model Elektronik 196, from Honeywell (Fort Washington, PA) and/or to an IBM compatible computer from Printaform (México).

The stock solution of casein was diluted to a concentration of 0.5 mg/ml with the buffer indicated above. A quartz cuvette containing 2 ml of the substrate was placed in the sample holder of the spectrofluorometer. When necessary (see below), the casein solution was stirred constantly. The sample was excited at a wavelength of 300 nm and emission was recorded at 350 nm. After obtaining basal readings with intact casein, proteinase (usually 10  $\mu$ g) was added, and the fluorescence recorded. Using purified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins stirring was not necessary.

#### Gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis was performed in the presence of tricine and sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) according to the method described by Schägger and von Jagow [4]. The gels were stained with Coomassie brilliant blue R, dried between two cellophane sheets and scanned densitometrically using a DU-50 spectrophotometer from Beckman Instruments (Palo Alto, CA).

#### $\alpha$ -Casein treatment with *o*-iodosobenzoic acid and cyanogen bromide

$\alpha$ -Casein was treated with *o*-iodosobenzoic acid (IBA), to cleave its Trp, according to Fontana et al. [5]. Briefly, 20 mg of  $\alpha$ -casein were dissolved in 10 ml of

80% acetic acid containing 4 M guanidine, 20  $\mu$ l of *p*-cresol and 40 mg of IBA. The mixture was incubated at room temperature in the dark. After 24 h, 50 ml of water was added and the solution was lyophilized; this procedure was repeated once more with the same preparation. Cleavage was confirmed by SDS-PAGE; the densitometric estimate of the yield of the cleaved product was 58%.

For treatment with cyanogen bromide (BrCN), 10 mg of  $\alpha$ -casein was dissolved in 1 ml of double distilled water and formic acid was added to a final concentration of 70%. BrCN at a concentration of 100 mg/ml in 70% formic acid was added so that BrCN was in 10-fold excess, on a weight to weight basis, with respect to casein. The atmosphere of the flask was flushed with nitrogen and the mixture incubated at room temperature in the dark. After 24 h, 50 ml of double distilled water was added and the solution was lyophilized. Cleavage was confirmed by SDS-PAGE; The densitometric estimate of remaining intact  $\alpha$ -casein was less than 1%.

#### Sequence analysis

Sequence data for  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$  and  $\kappa$ -casein were analyzed using the Fast P program of Lipman and Pearson [6]. Hydrophobicity calculations were corrected according to Kyte and Doolittle using the MSEQ program (University of Pennsylvania) and a window length of seven amino acids [7].

#### Results

##### Purified caseins

The electrophoretic components of commercial casein at pH 7 have been reported to be 75%  $\alpha$ -casein, 22%  $\beta$ -casein and 3%  $\gamma$ -casein (a peptide comprising residues 29–209 of  $\beta$ -casein) (Worthington Manual, 1988). It has also been reported that  $\kappa$ -casein can account for 10% of whole bovine casein [8]. Thus, we decided to determine if one or all of the purified components of casein accounted for the decrease in fluorescence observed with commercial casein.

Fig. 1 shows the decrease in fluorescence produced by 1 mg of whole commercial casein and purified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins after addition of either trypsin, chymotrypsin, papain, pronase or carboxypeptidase. The results show that  $\alpha$ -casein exhibited a fluorescence pattern that strongly resembled that of whole casein. Thus it would appear that the contribution of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein to the reduction of fluorescence is relatively small in all cases. Carboxypeptidase produced only a small effect with whole casein and  $\alpha$ -casein, probably because the carboxyterminal Trp was rapidly cleaved (see below). The effect of pepsin digestion on a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins (3:1) was tested. The lower right trace of Fig. 1 shows that the slope of the curve for reconstituted

casein was slightly less steep than for pure  $\alpha$ -casein. To determine the relative fluorescence of each purified component, the settings of the fluorometer were maintained constant for the various experiments with different proteinases. In all cases, purified  $\alpha$ -casein showed the highest initial fluorescence; whole and reconstituted casein exhibited a lower fluorescence. Purified  $\kappa$ -casein and purified  $\beta$ -casein had a low intrinsic fluorescence. It should be noted that  $\kappa$ -casein showed different fluorescence emission curves with chymotrypsin and pro-

nase (Fig. 1). Since  $\alpha$ -casein seems to account for most of the effect observed with whole casein, all further experiments were carried out with this purified component. For proteolytic assays, purified  $\alpha$ -casein could be easily dissolved without heating in all buffers, in contrast to whole casein.

When analyzed by SDS-PAGE,  $\alpha$ -casein showed a major component with a relative mass ( $M_r$ ) of 30000, as previously reported for pure  $\alpha$ S1-casein [9]. This component disappeared during digestion with different

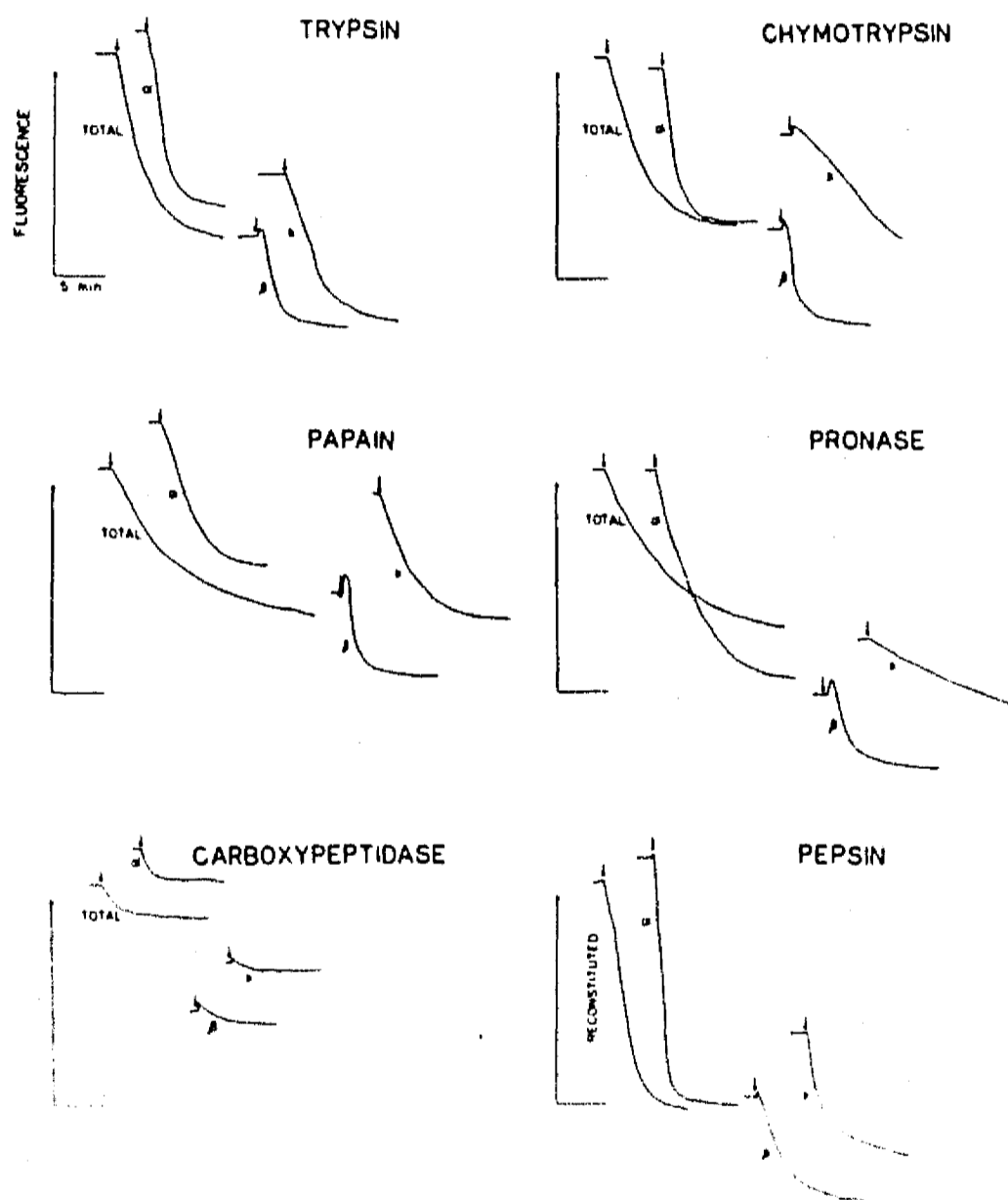


Fig. 1. Fluorescence emission recording of whole casein (Total) and purified  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\kappa$ , respectively) solutions (1 mg/2 ml) treated with 10  $\mu$ g of proteinase. A tracing with pepsin shows a fluorescence emission curve of a mixture of 75%  $\alpha$ -casein and 25%  $\beta$ -casein (Reconstituted) (final concentration 1 mg/2 ml). Arrows indicate the addition of the corresponding proteinase. The fluorometer settings for each individual proteinase were held constant.

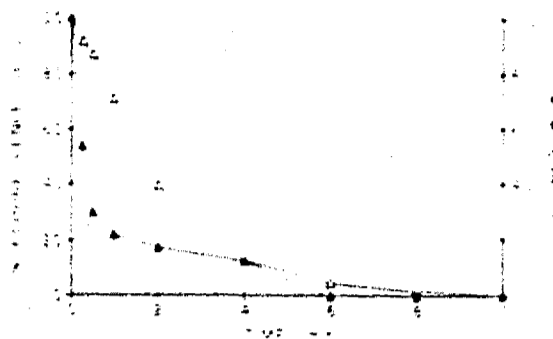


Fig. 2. Comparison between percent fluorescence remaining in an  $\alpha$ -casein solution (1 mg/2 ml) and the densitometric area of the 30 kDa band in SDS-PAGE at various times after the addition of 10  $\mu$ g trypsin. Both measurements were carried out in the same sample.

proteinases giving rise to different breakdown products. To ascertain if there was a correlation between the disappearance of the 30 kDa band and the decrease in fluorescence observed in different experiments, digestion was arrested at different times with trichloroacetic acid and the products analyzed by SDS-PAGE. The results were compared to the percent of fluorescence recorded for the same sample at the corresponding time. The results obtained with trypsin are shown in Fig. 2. At short incubation times, there is no correlation between the area of intact  $\alpha$ -casein and the disappearance of fluorescence. The initial slope of the densitometric data was steeper than that of the fluores-

TABLE I

The effect of various proteinases on the fluorescence of  $\alpha$ -casein

(A) Proteinases that decrease the fluorescence of  $\alpha$ -casein

Bromelain  
 Carboxypeptidase Y\*  
 Cathepsin B  
 Chymotrypsin  
 Endoproteinase Arg-C  
 Endoproteinase Glu-C  
 Endoproteinase Lys-C  
 Ficin  
 Papain  
 Pepsin  
 Pronase  
 Proteinases from *Streptomyces griseus* Types X, XIV and XVII  
 Subtilisin  
 Thermolysin  
 Trypsin

(B) Proteinases that have not decreased the fluorescence of  $\alpha$ -casein

Aminopeptidase M  
 Collagenase from *Clostridium histolyticum*  
 Elastase  
 Kallikrein  
 Plasmin  
 Proteinase from *Streptomyces griseus* Type XXI  
 Thrombin

\* partial quenching.

cence emission curve. This suggested that some initial breakdown products of  $\alpha$ -casein fluoresced as intensely as intact casein. After 4 min of incubation, most of the fluorescence and the 30 kDa component had disappeared. This band was not observed after 6 min of incubation and, at this time, the decrease in fluorescence had reached a maximum. Thus, the presence of the 30 kDa component seems to be necessary to observe some fluorescence emission. The same results were found at varying times for all proteinases that lowered casein fluorescence (Table I). With these data, it is possible to calculate relative units of activity, (defined as the amount of proteinase that can digest X  $\mu$ g of  $\alpha$ -casein in Y min) for a large number of proteinases using the same protein substrate.

Contribution of individual Trp to the decrease in fluorescence

An estimate of the role of individual Trp in the sequence of  $\alpha$ S1-casein for fluorescence loss was explored by chemical and enzymatic approaches.  $\alpha$ -Casein was first reacted with IBA to cleave Trp bonds. Analysis of the products by SDS-PAGE and densitometry revealed one band with an  $M_r$  of 31000 and a major band with an  $M_r$  of 26000 (Fig. 3A, bands I and II, respectively); two other minor bands with an  $M_r$  of 18000 and 14000 (bands III and IV, respectively) were observed. The four components represented 32.5%, 61.6%, 3.5% and 2.4% of the total area. We assumed that the 31 kDa band represented  $\alpha$ S1-casein (see above). Based on the sequence of both  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-caseins [10,11], the major 26 kDa component probably represents a fragment comprising amino acids 1 to 163 of  $\alpha$ S1-casein and, probably intact  $\alpha$ S2-casein (calculated molecular weight = 25230; [11]), but to a minor extent. The two minor components with an  $M_r$  of 18000 and 14000 correspond to fragments of  $\alpha$ S2-casein

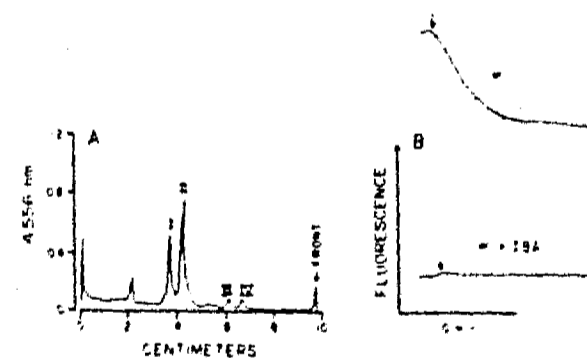


Fig. 3. (A) Densitometric scan of a gel containing  $\alpha$ -casein treated with IBA. Peaks marked I, II, III and IV have a molecular mass of 31, 26, 18 and 14 kDa, respectively. (B) Fluorescence emission recordings of an  $\alpha$ -casein solution (1 mg/2 ml) treated with 20  $\mu$ g of trypsin (upper tracing) and a solution of  $\alpha$ -casein treated with IBA (1 mg/2 ml) treated with the same amount trypsin (lower tracing).

containing amino acids 1 to 108 and 110 to 192, respectively. Thus, our preparation of  $\alpha$ -casein consisted of 94%  $\alpha$ S1-casein which was cleaved about 58% by IBA. As compared to intact  $\alpha$ -casein, this preparation had very low intrinsic fluorescence (Fig. 3B) i.e., its fluorescence did not decrease following the subsequent addition of trypsin. It is not clear why, even though the cleavage reaction was not 100% efficient, all fluorescence disappeared. It is possible that IBA reacted with all Trp, even though cleavage was not complete [5].

The amino acid sequence of all  $\alpha$ S1-caseins contain two Trps, one in position 164 (Trp-164) and a carboxy-terminal Trp in position 199 (Trp-199) [10]. The relative contribution to the loss of fluorescence of the individual Trp in  $\alpha$ -casein was determined using carboxypeptidase Y and trypsin. A representative experiment (Fig. 4 curve A) shows that after addition of carboxypeptidase, the fluorescence of  $\alpha$ -casein diminishes and reaches a plateau at approx. 30% of the maximal decrease, as inferred from the decrease induced by the addition of trypsin (curve B). Upon addition of trypsin, the fluorescence decreases an additional 70% (curve A). No further decrement was observed when carboxypeptidase was added after trypsin treatment of casein (curve B). Since SDS-PAGE analysis and cleavage of  $\alpha$ -casein gave results that were consistent with the fact that the  $\alpha$ -casein preparation consisted of almost pure  $\alpha$ S1-casein, the possibility could be ruled out that this partial decrease was due to the relative quantities of  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-casein. Treatment of  $\alpha$ -casein with aminopeptidase M results in minimal or no change in fluorescence (data not shown); it is noteworthy for the interpretation of the data that there are no Trp near the aminoterminal end in the sequence of  $\alpha$ S1-casein [10].

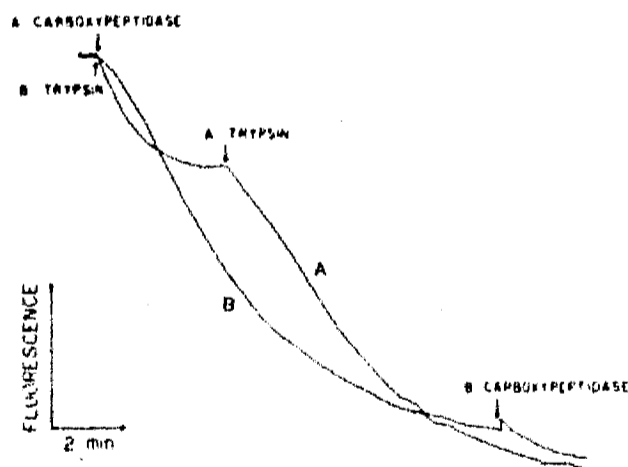


Fig. 4. Fluorescence emission recordings of  $\alpha$ -casein solutions (1 mg/2 ml) treated sequentially with 5  $\mu$ g of carboxypeptidase Y and 2  $\mu$ g of trypsin (curve A) or with the same proteinases added in inverse order (curve B).

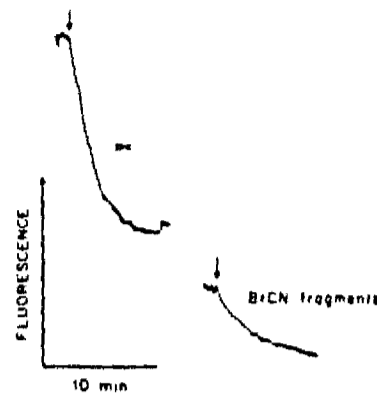


Fig. 5. Fluorescence emission recording of an  $\alpha$ -casein solution (1 mg/2 ml) treated with 10  $\mu$ g of trypsin (left tracing) and a solution of BrCN fragments of  $\alpha$ -casein (1 mg/2 ml) treated with the same amount of trypsin.

BrCN fragments of  $\alpha$ -casein were also examined. In principle BrCN should cleave the Met at positions 54, 60, 122, 135 and 196 of the sequence of  $\alpha$ S1-casein B, the main genetic variant in milk from *Bos taurus* [12]. Thus, cleavage by BrCN should yield two fragments that contain Trp, a large one comprising amino acids 136 to 195 and a tripeptide with amino acids 197 to 199. SDS-PAGE analysis of  $\alpha$ -casein treated with BrCN showed the absence of intact  $\alpha$ -casein (30-31 kDa component). The effect of trypsin on intact  $\alpha$ -casein and on the BrCN fragments was studied (Fig. 5). The latter showed a much lower initial fluorescence, and there was only a small, but clear decrease in fluorescence after the addition of trypsin. This small effect was most likely due to cleavage of the 136-195 fragment by trypsin and, as proposed previously [1], the proximity of the cleavage to Trp 164 could be related to the fluorescence response of the protein to trypsin. To test this hypothesis further, the effect of endoproteinases Arg-C, Glu-C and Lys-C were examined (Fig. 6). Endoproteinase Glu-C induced the highest rate of fluorescence loss, whereas with endoproteinase Arg-C and Lys-C, the rate of decrease was slower. The latter fluorescence emission curves are almost linear.

To find out if other proteins show a similar effect of decrease in fluorescence as a consequence of proteolytic cleavage, bovine serum albumin, lysozyme and a peptide made up of the last 14 amino acids of cytochrome *b*, and which contains a terminal Trp, were tested. Even though bovine serum albumin and lysozyme have two Trps (at positions 134 and 212) and six Trps (at positions 28, 62, 63, 108, 111 and 123) respectively, and the cytochrome fragment one, none of these proteins showed the fluorescence emission curves typical of  $\alpha$ -casein. In contrast, decreases and increases in fluorescence in the presence of various proteinases were observed.

Thus, the question arises as to what is unique in the sequence of  $\alpha$ S1-casein that causes this disappearance



of fluorescence. Shimizu and collaborators [13] determined the distribution of different segments of  $\alpha$ S1-casein adsorbed to an oil/water interface and analyzed their susceptibility to proteolysis by chymotrypsin and trypsin. Based on their results, they proposed a model where some hydrophobic regions of an  $\alpha$ S1-casein chain, (those close to residues 21 to 25, 94, 135 and 142) interact strongly with oil, while the other hydrophobic regions (those near residues 164, 165, and 166) that possess one Trp and two Tyr do not associate with the oil phase. Their results are shown schematically in the lowest part of Fig. 7. The top and middle segments of the same Figure illustrate the predicted charge of amino acids at pH 6.8 [10], as well as the hydrophobicity calculations according to Kyte and Doolittle [7]. The shading with small dots shows the most hydrophobic regions predicted by secondary structure calculations, and the shading with small lines correspond to slightly less hydrophobic regions. The amino acids with charge within the hydrophobic regions are labeled with the one letter amino acid code. The data on the calculated hydrophobic segments agree with the results of Shimizu and collaborators in all regions of the sequence that extend for more than four or five amino acids, except in the region starting with amino acid 159. Thus, besides other atypical characteristics in the sequence-

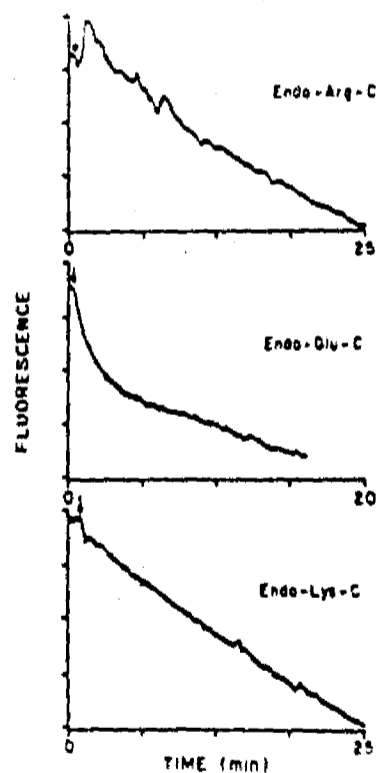


Fig. 6 Fluorescence emission recording of solutions of  $\alpha$ -casein (1 mg/2 ml) treated with 3.5  $\mu$ g of endoproteinase Arg-C, 20  $\mu$ g of endoproteinase Glu-C or 10  $\mu$ g of endoproteinase Lys-C.

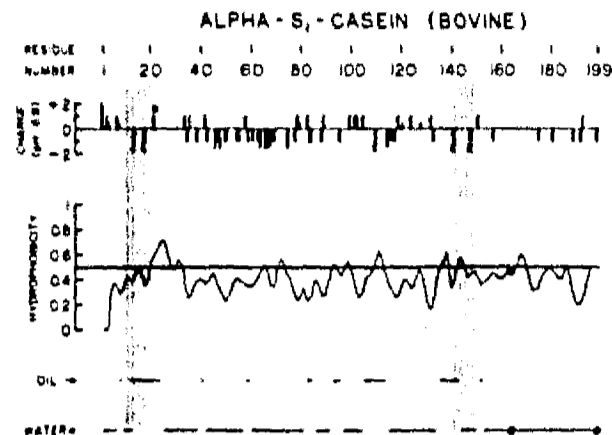


Fig. 7. Calculated charges at pH 6.8 and hydrophobicity indexes (Kyte and Doolittle) for the published sequence of  $\alpha$ S1-casein II and schematic representation of the distribution of different segments of an  $\alpha$ S1-casein chain adsorbed to an oil/water interface. The segments with the highest calculated hydrophobicity are in the shaded areas with points, and those segments of slightly less hydrophobic character are shaded with lines. Hydrophilic areas are unshaded. The amino acids with charge within hydrophobic segment are identified by the one letter amino acid code. Calculations of hydrophobicity were done according to the method of Kyte and Doolittle with a window setting of 7. The position of the Trp is indicated by two large black dots in the representation of the  $\alpha$ S1-casein chain adsorbed to the oil/water interface and one large black dot in the hydrophobicity index curve, since the value for the terminal Trp-199 was not calculated.

structure relationship of  $\alpha$ S1-casein, Trp-164 is within a hydrophobic sequence that behaves as in a hydrophilic domain. There are no experimental data for  $\alpha$ S2,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein in the aforementioned respect; the calculations of charges and hydrophobicity of these caseins indicate that the Trp in their respective sequences are not in or near hydrophilic domains (data not shown).

A sequence similarity analysis using the Fast P program of Lipman and Pearson [6] was carried out for the sequence of  $\alpha$ S1-casein and for a fragment of amino acids 150 to 199. No significant similarities were found in a search of 3606 sequences. Similar analyses were performed for  $\alpha$ S2-casein and a fragment that comprised amino acids 100 to 207,  $\beta$ -casein and a fragment with amino acids 110 to 180,  $\kappa$ -casein and a fragment with amino acids 45 to 90 were also examined. No significant similarity with non-casein proteins was found in any case. Thus, based on the results of this program, casein seems to possess a rather unique sequence.

#### Discussion

That  $\alpha$ -casein accounts for the decrease in fluorescence observed with whole casein [1], may not be surprising since it is the major component of caseins in commercial preparation; so in this respect, purified  $\alpha$ -casein has several advantages over whole casein as

substrate for the fluorometric assay of proteolysis. Heating is not necessary to solubilize  $\alpha$ -casein, since it is readily soluble in several buffers in a pH range of 2-9. Thus most proteolytic enzymes can be tested with this substrate. Plasmin, a proteinase that is known to digest  $\alpha$ S1-casein [14,15] did not produce any effect in the conditions we tested (Table I). Since our failure to observe the expected decrease in fluorescence may be due to quite a large number of factors, we did not investigate this point any further.

Trp-164 fluoresces because it is in a hydrophobic sequence and because its immediate environment must also have some hydrophobic character [16]. Yet, perhaps due to conformational constraints, this region behaves paradoxically as a hydrophilic segment [13] (Fig. 7). The results with BrCN peptides suggest that approx. 30 amino acids on each side of Trp-164 bear in the formation of this environment, since the peptide produced by cleaving the Met at positions 135 and 196, still had residual fluorescence which could be lowered by addition of trypsin (Fig. 5). This indicates that a cleavage closer to Trp-164 (trypsin can cleave the bonds between Arg-151 and Gln-152 and between Lys-193 and Thr-194 [13]), should produce a steeper and longer quenching signal. In fact it was previously observed that chymotrypsin, which can cleave the bonds between Try-154 and Gln-155 and between Trp-164 and Tyr-165 [13], brought about a steeper and longer quenching effect, on a per weight basis, than trypsin (Fig. 5 in Ref. 1). The closest possible cleavages near both Trps that could be produced by endoproteinases Arg-C, Glu-C and Lys-C are at Arg-151, Glu-148 and Glu-192, Lys-132 and Lys-193, respectively. According to our hypothesis, it can be predicted that endoproteinase Glu-C, which cleaves on both sides of Trp-164 and which could produce the shortest peptide, should produce the highest rate of decrease. The experimental results show that this is the case (Fig. 6). Apparently the cleavages produced by endoproteinases Arg-C and Lys-C have qualitatively a similar effect, even though endoproteinase Arg-C can produce only a peptide that contains both Trps.

Other proteins that were tested did not show the phenomenon of fluorescence disappearance to the extent observed with caseins. Proteins that are suitable as substrates for proteinases, are either soluble and hydrophilic, or insoluble and hydrophobic and/or denatured.

Casein is soluble and hydrophobic. Thus the sequence-structure relationship of the casein [8,12,17,18] seems to be quite unique with respect to the position and environment of Trp-164. Indeed, the fragment of  $\alpha$ S1-casein containing the sequence between amino acids 135 and 199 retains, although to a lesser degree, the property of decreasing its fluorescence upon further breakdown.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Subsecretaría de Regulación Sanitaria y Desarrollo, Secretaría de Salud and CONACYT, México, to R. P.M. The authors would like to thank Drs. A. Gómez-Puyou and D. González-Halphen for careful revision of the manuscript.

#### References

- Ostoa-Saloma, P., Ramirez, J. and Perez-Montfort, R. (1989) *Anal. Biochem.* 176, 239-243.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.B., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Fontana, A., Dalzoppo, D., Grandi, C. and Zambronin, M. (1983) *Methods Enzymol.* 90, 311-318.
- Lipman, D. and Pearson, W.R. (1985) *Science* 227, 1435-1441.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Modler, H.W. (1985) *J. Dairy Sci.* 68, 2195-2205.
- Creamer, L.K. and Richardson, T. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 476-486.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. and Ribadeau-Dumas, B. (1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 41-51.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C., Pelissier, J.P. and Das, B.C. (1977) *FEBS Lett.* 76, 274-284.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Harwalkar, V.R., Jenness, R. and Whitney, R. McL. (1984) *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631.
- Shimizu, M., Ametani, A., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 869, 259-264.
- Eigel, W.N. (1977) *J. Dairy Sci.* 60, 1399-1409.
- Aimutis, W.R. and Eigel, W.N. (1982) *J. Dairy Sci.* 65, 175-181.
- Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 341-382, Plenum Press, New York.
- Creamer, L.K., Richardson, K.T. and Parry, D.A.D. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 689-696.
- Byler, D.M., Farrell, H.M. and Susi, H. (1988) *J. Dairy Sci.* 71, 2622-2629.

## DISCUSION GENERAL y PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos así como de las conclusiones a la que estos nos llevan, podemos inferir perspectivas y objetivos nuevos dentro de los campos de investigación que abarca esta tesis.

De los resultados obtenidos en los trabajos 1 y 2, se desprende que la actividad proteolítica entre varias cepas de la misma especie amibiana (E. histolytica) varia cualitativamente. El patrón de zimograma es similar pero la actividad proteolítica es distinta, lo cual hace pensar en una variación genética entre estas proteasas que las hace ser más o menos activas. Si las conclusiones del trabajo 2, con sus reservas, en el sentido que hay una relación estructural entre las distintas proteinasas de E. histolytica, son certeras, se puede especular que incluso todas ellas puedan salir de un mismo gene. Con todos estos elementos resultaría fácil explicar que por variaciones en este gene primordial todas las demás proteasas resultan igualmente modificadas variando con eso la actividad de manera uniforme. Una de las características de la actividad proteolítica de E. histolytica es su variabilidad. Existen al menos 6 proteinasas que pueden ser detectadas por la técnica de zimograma en todas las cepas de E. histolytica analizadas (ver zimograma trabajo 1); si consideramos que estas proteinasas actúan de manera independiente resultaría asombroso encontrar que todas bajan o suben su actividad de manera uniforme; por otra parte existe la posibilidad de que de las seis proteinasas, sólo una de ellas

tenga la mayoría de la actividad proteolítica total detectada ; las variaciones en esta única proteinasa explicarían las variaciones de la actividad proteolítica total. Los resultados reportados para 3 proteinasas de E. histolytica (de diferente cepa), y que apuntan en el sentido de que todas tienen una alta actividad e incluso se les ha reportado como la principal proteinasa de E. histolytica (ref. 40 41,54, trabajo 2), indican que la ésta última hipótesis no es muy viable. Esto nos deja, por lo tanto la hipótesis de un gene altamente variable del cual proceden todas las demás proteinasas.

La perspectiva es por lo tanto, encontrar este gene único en el que se estudiaría si la generación de las proteinasas es a nivel de transcripción o si es producto de modificaciones postraduccionales de la proteinasa generada por este gene único. Esta hipótesis predice que habrá variaciones a nivel de DNA entre las proteinasas aisladas de distintas cepas.

Las conclusiones del tercer trabajo nos llevan a plantear el desarrollo de un sustrato universal para proteasas o al menos un sustrato de amplio espectro que no pierda por esto su especificidad. En el trabajo 3 se establece que la característica de la caseína de apagar su fluorescencia durante su proteolisis, es aparentemente exclusiva de ella ya que al utilizar otras proteínas con alto contenido de triptofano, el fenómeno no se observa. Esto nos lleva a la pregunta de ¿que tiene la estructura de la caseína que no tienen las otras proteínas?. En el trabajo 3, también se establece que el descenso de la fluorescencia se debe a un cambio en la polaridad del ambiente del triptofano que

genera la señal. Considerando lo anterior, una primera aproximación para explicar esta diferencia es la de analizar la secuencia de aminoácidos que conlindan con el triptofano y deducir su posible ambiente. La secuencia de aminoácidos que flanquean al triptofano en la  $\alpha$ ,  $\beta$  y k caseína son los siguientes:

$\alpha$ S1-Caseína : NHPro-Ser-Gly-Ala-TRP-Tyr-Tyr-Val-ProCOOH  
 $\beta$ -Caseína : NHPro-Leu-Leu-Leu-Gln-Ser-TRP-Met-His-Gln-ProCOOH  
k-Caseína : NHPro-Ala-Gln-Iso-Leu-Gln-TRP-Gln-Val-Leu-SerCOOH

De la secuencia que precede al triptofano se observa que todas ellas presentan una prolina muy cercana, la prolina es un aminoácido que rompe la  $\alpha$ -hélice; los aminoácidos que siguen a la prolina favorecen la estructura  $\beta$ -plegada, por lo que es posible que ésta sea la estructura secundaria donde se encuentra el triptofano en las tres caseínas. En la  $\alpha$ S1-Caseína, los aminoácidos que en la secuencia están próximos al triptofano tienen un índice de hidropatía intermedio según la escala de Kyte y Doolittle (ref. 7 trabajo 3) el más alto es el de la Alanina (1.8) y el más bajo el de la Tirosina (-1.3) es decir que la polaridad del ambiente favorece tanto las interacciones hidrofóbicas como el contacto con el agua. En el caso de la  $\beta$  y k Caseína, la secuencia en cuanto a hidropatía no es tan uniforme aunque mayoritariamente encontramos aminoácidos hidrofóbicos; el aminoácido más hidrofílico que encontramos en la secuencia es Glutamina, probablemente la inclusión de aminoácidos muy hidrofílicos en la secuencia que conlinda con el triptofano de la  $\beta$  y k Caseína haga que la fluorescencia basal, con respecto a la  $\alpha$ -Caseína, sea menor. Analizando la secuencia de otras proteínas, que tienen triptofano pero que no se comportan como

las caseínas, como albúmina y lisozima encontramos que los triptofanos que tienen se encuentran en estructuras de  $\alpha$ -hélice y los aminoácidos que conlindan con el triptofano son de los más hidrofílicos (Lisina y arginina). Por supuesto que para hacer un análisis más detallado se necesita conocer la estructura terciaria de la proteína para evaluar las interacciones a larga distancia que puedan influir en el fenómeno de apagamiento de la fluorescencia. Sin embargo, para nuestro objetivo se puede partir de las características de la  $\alpha$ S1-Caseína que ya se han deducido y que son: un triptofano que se encuentre en una estructura  $\beta$ -plegada rodeado de aminoácidos con un índice de hidropatía intermedio. La  $\alpha$ S1-caseína nos brinda la oportunidad de partir de su estructura e incluso reducir ésta a una secuencia de 60 aminoácidos ( $\alpha$ S1-C60), secuencia que aún conserva parte de las propiedades de la  $\alpha$ S1-caseína completa. Además de la estructura básica de la  $\alpha$ S1-C60, se requiere que el sustrato presente una secuencia atractiva para la mayoría de las proteasas conocidas. Afortunadamente, la naturaleza ha creado esa secuencia en una proteína sérica de un alto peso molecular que se llama  $\alpha$ 2-Macroglobulina ( $\alpha$ 2-M). La  $\alpha$ 2-M es uno de los inhibidores de proteasas más efectivos que se conoce dado su amplio espectro de inhibición; todas las proteasas que inhibe la  $\alpha$ 2-M atacan a este inhibidor en una región de 25 aminoácidos flanqueada por prolinas que se denomina "región anzuelo"; casi todas las proteasas conocidas hidrolizan algún enlace de dicha secuencia. La perspectiva es por lo tanto, a mi manera de ver, la conjunción entre las características estructurales de la  $\alpha$ S1-C60 y la

característica hidrolizable de la región anzuelo. Ciertamente, la introducción de la región anzuelo dentro de la estructura de la  $\alpha$ S1-C60 puede dar lugar a transformaciones estructurales incompatibles con las propiedades estructurales originales, pero eso es parte del estudio que tiene que hacerse.

## RESUMEN

La presente tesis esta dividida en dos capitulos. El primer capitulo se refiere a las proteinasas de Entamoeba histolytica. El capitulo comprende dos articulos. En el primero, se estudió la amibiasis experimentalmente en el testiculo de rata. El grado de inflamación y necrosis producido por diferentes cepas de E. histolytica se correlacionó con la actividad proteolitica y con zimogramas tratando de contestar la pregunta de si hay una relación cualitativa o cuantitativa entre las proteasas amibianas y la virulencia del parásito. Se establece que en la necrosis tisular no sólo es importante el nivel de actividad proteolitica sino que también lo es el tipo de proteinasa producida por el parásito. El segundo articulo presenta los resultados preliminares acerca de la relacion estructural entre dos proteinasas de E. histolytica. Dos proteinasas fueron purificadas de extractos de trofozoitos de E. histolytica cepa HM-1. Las proteinas purificadas se compararon por medio de la técnica de mapas peptidicos unidimensionales. La conclusión es que ambas proteinas tienen una similitud estructural.

El capitulo 2 nos habla acerca de las proteasas y de los métodos para medir la actividad proteolitica. El capitulo incluye un articulo donde se explica a nivel molecular el descenso de la fluorescencia de la caseína durante la digestión de ésta. Los resultados indican que el medio ambiente del TRP que genera la señal es muy importante en el decremento de la fluorescencia observado durante la digestión de la caseína. Se discute la razón de porque sólo la caseína y no otras proteinas exhiben un decremento en la fluorescencia durante la proteólisis.



#### ABSTRACT

The thesis has into two chapters. The first chapter has two articles about proteinases of Entamoeba histolytica. In the first paper amebiasis was studied experimentally in the rats testis. The degree of inflammation and necrosis produced by diferent strains was correlated with proteinase activity and with zymograms. The results suggest that the pathogenic potential of Entamoeba spp. in the rat testis may be related to the type and the level of their proteolytic activity. The second paper is a preliminary report about the structural relationships between two proteinases of E. histolytica. Two "major" neutral cysteine proteinases were purified from extracts of HM-1 trophozoites and were compared using peptide mapping. The conclusion is that both proteins have substantial structural similarity.

Chapter two is about proteases and methods for the measurement of proteolytic activity. The chapter include a paper where a method for the measurement of casein digestion, using fluorescence emission, is explained at molecular level. The results indicate that the particular environment of TRP in the sequences of the caseins is crucial for the decrease in fluorescence that is observed during the casein digestion. The reason that caseins and not other proteins, exhibit a decrease in fluorescence upon proteolysis is discussed.