

8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA
CALRETICULINA DE *Taenia solium*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

PRESENTA:
FELA MENDLOVIC PASOL

DIRECCIÓN DE TESIS:
DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
Y
DR. PEDRO OSTOA-SALOMA

MEXICO, D.F.

OCTUBRE, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

A mis papas, Samuel y Alicia...

A mis hermanos, Betty y Alex...

A mis abuelos, Sonia e Israel z"l...

Fela z"l y Adolfo z"l...

A mis hijos, Enrique, Daniel y Nathan...

A Salomón...

Con mucho cariño.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Juan Pedro Laclette en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Pedro Ostoa-Saloma y la Dra. Ana Flisser Steinbruch. Su realización estuvo apoyada por los proyectos DGAPA UNAM IN'225798 y CONACyT. 28094-B El Dr. Marshall Lightlowers donó la biblioteca de expresión, los Q.F.B. Joel Martínez Ocaña y Cecilia Hirota prepararon los sueros anti-glicoproteínas y la M. en C. Patricia de la Torre realizó las secuenciaciones de DNA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México...

A la Dra. Ana Flisser por abrirme las puertas a la ciencia después de tantos años, actividad que tanto disfruto. Por sus consejos y enseñanzas, por su confianza, apoyo, y muy especial amistad...

Al Dr. Juan Pedro Laclette por recibirme en su laboratorio, por sus comentarios y orientación durante la realización de este trabajo...

Al Dr. Pedro Ostoa Saloma por su ayuda incondicional y la valiosa orientación en la realización de esta tesis, por siempre estar dispuesto a compartir sus conocimientos y a escucharme, por brindarme su amistad...

A Patricia de la Torre por realizar la secuenciación del DNA...

A Julio César, Paty, Carlos, Haydée, Martín, Rima, Pavel, Laura, Dayana, Pepe, Celia y Ana por hacerme sentir parte del grupo de trabajo, por su amistad, apoyo, compañía, interesantes discusiones y disposición a ayudarme siempre...

Gracias.

ÍNDICE

	Página
RESÚMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCIÓN	1
<i>Taenia solium</i>	1
Calreticulina	3
Calreticulina en Parásitos	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	8
Biblioteca de cDNA Lambda ZAPII de parásito adulto	8
Suero hiperinmune de conejo anti-glicoproteínas de <i>T. solium</i>	8
Cepas de bacterias	8
Cuantificación de la concentración de proteínas	9
Electroforesis en geles de poliacrilamida	10
Western Blot	10
Preadsorción de los sueros de conejo	11
Preparación de bacterias para el inmunotamizaje	11
Inmunotamizaje de la biblioteca de parásito adulto	11
Tamizaje por hibridación de DNA	12
Secuenciación y análisis de DNA	13
PCR para la obtención de TsCRT con los sitios <i>Eco</i> RI	14
Digestión enzimática del DNA	14
Construcción del vector de expresión pET 23-a-CRT	15
Preparación y transformación de bacterias competentes	15
Expresión y extracción de TsCRT recombinante (TsCRT _r)	16
Purificación de la TsCRT _r por punto isoelectrico	17
Ensayo de unión a ⁴⁵ Ca ⁺⁺	17
RESULTADOS	18
Aislamiento DE las clones que codifican para TsCRT	18
Clonación y expresión de TsCRT _r	23
Purificación por punto isoelectrico de la TsCRT _r	27
Ensayos de unión a Ca ⁺⁺	28

DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	35
REFERENCIAS	36

RESUMEN

La caracterización de las proteínas involucradas en la fisiología de los parásitos es crucial para comprender la relación hospedero-parásito y la modulación de la respuesta inmune. La calreticulina fue identificada como una proteína que une Ca^{++} en el retículo endoplásmico controlando la homeostasis intracelular de este ión y regulando diversos procesos fisiológicos. Se ha reportado además que tiene una actividad de chaperona y de lectina, involucrada en el correcto plegamiento de proteínas N-glicosiladas, modula la expresión génica, afecta las propiedades de adhesión de algunas células capacitándolas para reconocer y responder a estímulos extracelulares. En este estudio se reporta la caracterización de la calreticulina de *Taenia solium* (TsCRT). Se inmunotamizó una biblioteca de cDNA del estado adulto de *Taenia solium* usando un suero de conejo hiperinmune generado contra las glicoproteínas inmunogénicas del parásito. El cDNA que codifica para la TsCRT fue clonado en el vector de expresión pET 23a. Con este plásmido se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21. Para el ensayo de unión a Ca^{++} las bacterias inducidas se separaron por SDS-PAGE, transfirieron a membranas de nitrocelulosa e incubaron con $^{45}\text{Ca}^{++}$. Se aisló el cDNA que codifica para el marco de lectura completo de la TsCRT. La secuencia fue analizada y se identificó una secuencia señal entre los residuos 1 y 18, empezando la proteína madura en la posición 19. La proteína muestra dos secuencias consenso características de la familia de las calreticulinas, además de la señal de retención de retículo endoplásmico y dos conjuntos de tres repeticiones que representan a la región en la proteína que une Ca^{++} con alta afinidad y son importantes para la actividad de chaperona. La TsCRT tiene 47.12%, 48.11%, 49.92% y 49.16% de identidad con la calreticulina de *Schistosoma japonicum*, *Onchocerca volvulus*, *S. mansoni*, y humana respectivamente. Los resultados indican que la proteína recombinante pertenece a la familia de las calreticulinas, tiene un peso molecular aparente de 50 kDa y conserva propiedades funcionales como la capacidad de unir Ca^{++} .

ABSTRACT

Characterization of proteins involved in the physiology of parasites is critical for understanding host-parasite relationships and modulation of immune responses. Calreticulin was identified as a Ca^{++} binding protein in the endoplasmic reticulum, controlling intracellular Ca^{++} homeostasis, and regulating several physiological processes. It has lectin-like chaperoning activity involved in the correct folding of glycoproteins, modulates gene expression, affects adhesion properties of some cells and enables them to recognize and respond to extracellular stimuli. In the present study the characterization of *Taenia solium* calreticulin is reported. An adult *Taenia solium* cDNA library was immunoscreened using rabbit hyper-immune serum raised against immunogenic glycoproteins. The cDNA encoding *Taenia solium* calreticulin (TsCRT) was cloned into pET23a expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 strain. Bacteria were induced with IPTG and grown for 4h. For the Ca^{++} binding assay, the induced culture was separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with $^{45}\text{Ca}^{++}$. The full-length calreticulin encoding cDNA was isolated, the sequence was analyzed, and the putative signal peptide was identified between residues 1 and 18, with the mature protein starting at residue 19. It shows two putative calreticulin family signatures, an endoplasmic reticulum retention signal, and includes two sets of three repeats, which represent the region of the protein that binds Ca^{++} with high affinity and are essential for the chaperone activity. TsCRT shows 47.12%, 48.11%, 49.62% and 49.16% identity to *Schistosoma japonicum*, *Onchocerca volvulus*, *S. mansoni*, and human calreticulin respectively. Recombinant calreticulin was identified in SDS-PAGE as a 50 kDa protein. Recombinant TsCRT was successfully expressed in *E. coli* and shown to bind Ca^{++} in a $^{45}\text{Ca}^{++}$ overlay assay. The results obtained indicate that TsCRT belongs to the calreticulin family and was expressed as a 50 kDa functional recombinant protein with the ability to bind Ca^{++} .

INTRODUCCIÓN***Taenia solium***

El céstodo *Taenia solium* es el agente causal de teniosis en el humano, así como de cisticercosis en el cerdo y de manera accidental en el hombre. Estas enfermedades son causadas por dos de los estadios del parásito. La primera es producida por la fase adulta o tenia, que se aloja en el intestino delgado del hombre. La segunda, es producida por la fase larvaria o metacéstodo, el cual se desarrolla principalmente en el sistema nervioso central (neurocisticercosis), ojo, músculo esquelético y tejido subcutáneo (cisticercosis muscular y subcutánea) (Flisser, 1994). Estas parasitosis afectan principalmente a países en vías de desarrollo, en donde son consideradas problemas de salud pública. Sin embargo, la incidencia en países desarrollados ha aumentado debido a la inmigración de individuos con teniosis. A partir del año 2000 la cisticercosis es considerada como una enfermedad emergente en los Estados Unidos de Norteamérica (Flisser, 2002). Recientemente, se ha demostrado que los portadores de la tenia son el principal factor de riesgo en la transmisión de la neurocisticercosis, que es la forma más grave y frecuente de la enfermedad y es la principal parasitosis del sistema nervioso central (Sarti, 1997; White, 1997).

El ciclo de vida de este parásito involucra al ser humano como hospedero definitivo del parásito adulto, así como intermediario, junto con el cerdo, del metacéstodo o cisticerco. La teniosis es adquirida al ingerir cisticercos vivos en la carne de cerdo inadecuadamente cocida. El parásito evagina, se adhiere a la mucosa intestinal a través de las ventosas y ganchos del escólex y desarrolla a partir del cuello un gran número de segmentos llamados proglótidos. Los proglótidos grávidos llenos de huevos son liberados en las heces y al ser ingeridos por seres humanos o cerdos en alimentos o agua contaminadas causan cisticercosis, completándose así el ciclo de vida (Flisser, 1994; Rabiela *et al.*, 2000).

El parásito adulto o tenia consta de un escólex formado por cuatro ventosas y un roseto con una doble hilera de ganchos con las que se ancla a la mucosa intestinal, una region llamada cuello y el resto del parásito está constituido por una serie de segmentos o proglótidos llamado estróbilo que llega a medir de 2 a 7 m. Conforme la tenia crece, desarrolla nuevos proglótidos a partir de la región del cuello donde se encuentran las células troncales responsables. Los proglótidos ya existentes maduran, dando lugar a proglótidos grávidos en la porción terminal del estróbilo ya que *Taenia solium* es un parásito hermafrodita y presenta órganos sexuales masculinos y femeninos en cada segmento. Los proglótidos grávidos que contienen aproximadamente 60.000 huevos, se separan del estróbilo y se eliminan con el excremento del individuo infectado.

Los huevos maduros contienen las oncosferas rodeadas de la membrana oncosferal, el embrióforo y en la parte más externa, el vitelo. Estas envolturas permiten la viabilidad de los huevos en condiciones de temperatura y de sequia extrema en el medio ambiente. El embrióforo está formado por una serie de bloques contiguos unidos por una substancia cementante que es susceptible a la acción enzimática en el intestino. Al separarse los bloques embriofóricos, la membrana oncosferal se permeabiliza y permite la activación del embrión y su salida de dicha membrana gracias a los movimientos de los seis ganchos que contiene, que son diferentes a los del cisticerco (Lethbridge, 1980; Silverman, 1954). El embrión es capaz de atravesar la pared intestinal asistido por el movimiento de los ganchos y la secreción de las glándulas de penetración. Aunque se sabe muy poco acerca de los mecanismos de invasión de las oncosferas, se ha demostrado que éstas producen peptidasas que son productos de secreción/excreción que pudieran estar involucradas y facilitar el proceso invasivo (White *et al.* 1996). Finalmente penetra los vasos sanguíneos en la submucosa y se aloja preferentemente en músculo estriado y sistema nervioso central en donde se transforma en el estadio larvario denominado cisticerco o metacéstodo (Yoshino, 1933; Flisser, 1994).

El metacéstodo o cisticerco se desarrolla en el cerdo aproximadamente a las 10 semanas postinfección, etapa en la que ya es infectivo para el hombre. El cisticerco celuloso es esférico y consta de un escólex, que es idéntico al del parásito adulto, un cuello y una vesícula formada por una pared translúcida y el líquido vesicular. Este es el tipo más común y las características morfológicas de los parásitos alojados en cerdos y seres humanos son muy similares y normalmente están rodeados por una cápsula de tejido conectivo del hospedero. (Slais, 1973; Aluja, 1988; Flisser, 1994). En el cerebro humano se ha descrito otro tipo de cisticerco que se localiza en los ventrículos. Estos cisticercos denominados racemosos, no tienen escólex, presentan una vesícula lobulada, llegan a medir hasta 20 cm y contienen 90 ml de fluido vesicular. Asimismo se han descrito formas intermedias en las que el escólex es claramente identificable y presentan una vesícula bilobulada (Rabiela *et al.*, 1989).

Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional ubicua y altamente conservada a nivel de su organización genómica y secuencia de aminoácidos. Esta característica denota su importancia fundamental en los sistemas biológicos. Se ha descrito en todas las células eucariontes analizadas incluyendo parásitos. En bacterias y levaduras, cuyo genoma ha sido secuenciado, no se ha encontrado el gen de la CRT (Michalak, *et al.*, 1999; Johnson, 2001). Inicialmente fue descrita en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y su principal función es la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , controlando los niveles de Ca^{2+} intracelular que a su vez influyen en procesos celulares importantes como secreción, contracción-relajación, motilidad y adhesión celular, síntesis de proteínas y expresión génica. Más aún, la CRT es una proteína chaperona con características de lectina que une polipéptidos N glicosilados por medio del reconocimiento de oligosacáridos formados por Glc(1)Man(9)GlcNac(2) que se encuentran en múltiples glicoproteínas, y es la

encargada del control de calidad del correcto plegamiento de las mismas (High *et al.*, 2000; Ellgard and Helenius, 2001). Recientemente se identificó la CRT en la superficie celular de linfocitos (Arosa *et al.*, 1999). Se han descrito tres dominios estructurales para las CRT (Fig. 1). El dominio N o extremo amino terminal que es globular, une Zn^{2+} ($K_d \sim 300 \mu M$, 14 mol/mol de proteína) (Baksh, 1991; Khanna *et al.* 1986) y participa en la interacción con otras proteínas chaperonas del retículo endoplásmico. El dominio P, comprende una secuencia rica en prolinas que presenta dos conjuntos de tres repeticiones con la secuencia PxxIxDPDAxKPEDWDE (repetición A) seguida por la secuencia GxWxPPxIxNPxYx (repetición B), esenciales para la unión de Ca^{2+} con alta afinidad ($K_d \sim 1 \mu M$, 1 mol de Ca^{2+} /mol de proteína) y para la función de lectina. El dominio C que, a pesar de su polimorfismo inter-especie, conserva un sitio de baja afinidad y alta capacidad de unión a Ca^{2+} ($K_d = 2 mM$, ~ 25 mol/mol de proteína), este dominio es ácido, está cargado negativamente y funciona como "sensor de Ca^{2+} " para la interacción con otras proteínas del RE (Ostwald and MacLennan, 1974; Baksh and Michalak, 1991; Michalak and Corbett, 2000). Los dominios N y P están altamente conservados y tienen un papel importante en la función de chaperona de la CRT (Nakamura *et al.*, 2001).

Calreticulina en Parásitos

Se ha descrito la CRT en diferentes parásitos, sin embargo sus funciones no se han dilucidado del todo. Se han identificado homólogos de CRT en *Trypanosoma sp.*, *Leishmania sp.*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Onchocerca volvulus* y *Necator americanus*, (Labriola *et al.*, 1999; Scott and McManus, 1999; Hooker y Brindley, 1999; Kasper *et al.*, 2001). En tripanosomosis, esquistosomosis y oncocercosis, así como en enfermedades autoinmunes, se ha reportado la presencia de anticuerpos anti CRT en pacientes (Rokeach *et al.*, 1994; Marcelain *et al.*, 2000; Eggleton *et al.*, 2000). Así mismo, se ha demostrado que la CRT es uno de los antígenos inmunodominantes en la vacuna de cercaria irradiada de *S. mansoni* y que es capaz de estimular

linfocitos B y T *in vitro* (Nalga *et al.*, 2000; Ribeiro de Jesús *et al.*, 2000). Recientemente se ha reportado que tanto la CRT humana como la del nemátodo *N. americanus* une y neutraliza la actividad del componente C1q de la cascada de complemento y reacciona con dominios de señalización de integrinas de plaquetas y otros leucocitos (Kasper *et al.*, 2001; Kovacs *et al.*, 1998). En *S. mansoni*, se demostró la presencia de CRT en los diferentes estadios del parásito (Khalife *et al.*, 1994). En la cercaria se encuentra alrededor de las glándulas de penetración, lo que sugiere que es secretada/excretada en la fase invasiva y que module la actividad de proteasas dependientes de Ca^{++} . Por otro lado, en el parásito adulto se reportó la expresión preferencial en los órganos genitales, por lo que los autores sugieren que pudiera estar involucrada en el control de la proliferación celular. El carácter multifuncional de la CRT le confiere la capacidad de poder responder a estímulos extracelulares y coordinar las respuestas celulares (Nakhasi *et al.*, 1998).

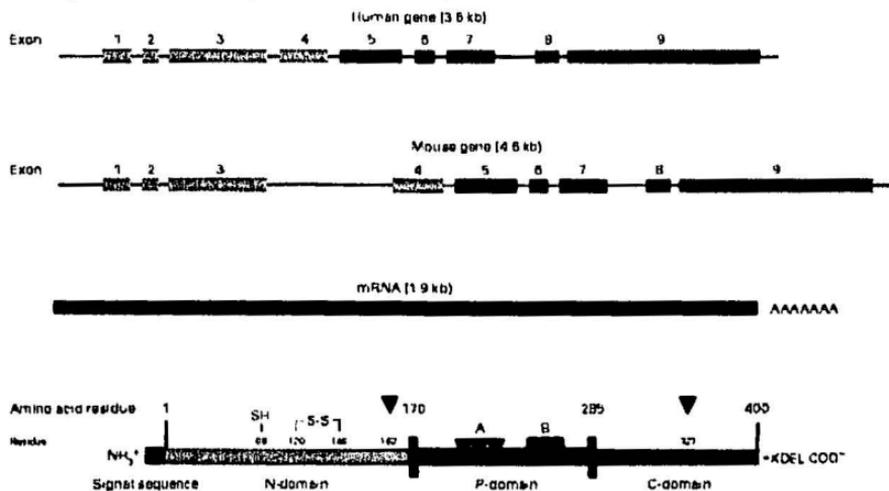


Figura 1. Representación esquemática del gen de calreticulina humana y murina, el mRNA y la proteína. Configuración genómica del gen de calreticulina del humano y ratón con los exones que codifican para los tres dominios de la proteína. Dominio N (azul), dominio P (rojo) y dominio C (verde). La proteína representada con los mismos colores, contiene el péptido señal, la señal de retención de retículo endoplásmico. Los conjuntos de tres repeticiones A y B están representados por los triángulos y cuadrados morados respectivamente. Los triángulos negros representan los sitios potenciales de glicosilación. Michalak *et al.*, 1999)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La patología y la clínica de la cisticercosis humana son muy heterogéneas y dependen de la localización, tipo y número de cisticercos, así como del estado general del paciente. La neurocisticercosis es la manifestación más severa de la enfermedad. Pacientes con la forma activa de la enfermedad desarrollan una respuesta inflamatoria, que incluye la infiltración de diferentes poblaciones de linfocitos, macrófagos, granulocitos, eosinófilos y células plasmáticas.

El inicio de la sintomatología por neurocisticercosis ha sido relacionada con la inhabilidad del parásito de modular la respuesta inflamatoria del hospedero (White *et al.*, 1997.). Existe poca información acerca de las proteínas sintetizadas por *T. solium* y sus funciones en las diferentes etapas de su desarrollo. Se han descrito proteínas que producen los metacéstodos y que regulan la respuesta inmune del hospedero, incluyendo la paramiosina que inhibe la activación de complemento (Laclette *et al.*, 1992); la taeniastatina que, además de inhibir la activación de complemento, bloquea la función de leucocitos (Hammerberg and Williams, 1978; Leid *et al.*, 1989); proteasas que actúan sobre IgG específicas (White *et al.*, 1992) y más recientemente un factor del metacéstodo producido *in vitro* por cisticercos que inhibe la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos, la respuesta humoral y celular contra antígenos específicos del metacéstodo y la respuesta inflamatoria (Molinari *et al.*, 1990; Tato *et al.*, 1995; Arrechavaleta *et al.*, 1998). Por otro lado se sabe que la destrucción de las oncósferas está mediada por la vía clásica de complemento (White *et al.*, 1997). Por lo tanto, es importante identificar y caracterizar las proteínas involucradas en la fisiología del parásito para entender mejor la relación con el hospedero y la modulación de la respuesta inmune.

Durante el inmunotamizaje de clonas de cDNA que codifican para antígenos que pudieran ser útiles para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis, *i.e.* glicoproteínas de bajo peso molecular, se aisló una clona que codifica para la CRT de *Taenia solium* (TsCRT). El carácter multifuncional de la CRT sugiere

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

que esta proteína podría estar involucrada en los procesos biológicos y de inmunomodulación en la relación hospedero-parásito. Su caracterización y subsecuente localización, abren una amplia línea de investigación que incluye su papel en la fisiología del parásito, la interacción con otras proteínas del parásito y del hospedero, su expresión diferencial y regulación génica en los diferentes estadios del ciclo de vida. Adicionalmente, incluye su participación en las respuestas humoral y celular protectoras y en los fenómenos de inmunomodulación del parásito, así como su probable uso en pruebas de diagnóstico, como agente terapéutico y de vacunación.

OBJETIVOS

- Obtener la CRT completa de una biblioteca de cDNA de *T. solium* de adulto.
- Secuenciar, clonar y expresar la TsCRT.
- Purificar y demostrar la capacidad de la TsCRT recombinante de unir Ca^{++} .

MATERIAL Y MÉTODOS

Biblioteca de cDNA Lambda ZAPII de parásito adulto

La biblioteca de parásito adulto fue construida en el vector lambda ZAPII por Claudia García Domínguez (García-Domínguez, 1993) y fue donada por Marshall Lightowlers de la Universidad de Melbourne, Australia. La biblioteca fue preparada mediante el uso de kits comerciales (Amersham, Cat. No. RPN125). El cDNA de parásitos adultos se ligó a adaptadores Eco RI compatibles con el vector. El cDna "adaptado" se fosforiló, ligó a los brazos del vector lambda ZAPII y se empacó *in vitro* utilizando Gigapack II gold packaging extract siguiendo las instrucciones del proveedor (Stratagene, Cat. No. 200216).

Suero hiperinmune de conejo anti-glicoproteínas de *T. solium*

Tres glicoproteínas específicas de *T. solium*, i.e., GP24, GP39-42 y GP50 se utilizaron para inmunizar a tres conejos (un conejo por cada glicoproteína). La administración fue por vía intramuscular con 1mg de cada glicoproteína emulsionado con adyuvante completo de Freund (1:1). En el día 13 se administró una segunda dosis y el sacrificio de los animales se realizó el día 21, obteniendo la mayor cantidad de sangre por punción intracardiaca. Este procedimiento fue realizado por la QFB Cecilia Hirota en el laboratorio de la Dra. Ana Flisser (Plancarte *et al.*, 1999).

Cepas de bacterias

La tabla 1 enlista las cepas de bacterias y su uso.

Tabla 1. Cepas de bacterias empleadas.

Cepa	Genotipo	Uso
XL-1Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1/lac^r F'[proAB+lac^qlacZ^{m15}Tn10(<i>tef'</i>)]</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adsorción de los sueros de conejo. 2. Inmunotamizaje de la biblioteca de parásito adulto y escisión del fagémido pBluescript. 3. Transformación con el plásmido pET23a-TsCRT.
BL-21	F ['] <i>ompThsdS_B(r_B-m_B-)</i> gal dcm (DE3)	Expresión del plásmido pET23a-TsCRT.

Las bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB, 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl y aforar a 1 litro con H₂O; esterilización por autoclave.) a 37°C, durante toda la noche.

Quantificación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el ensayo de proteínas de BioRad (BioRad, Cat. No. 500-0006), basado en el método descrito por Bradford (1976). Se prepararon varias diluciones de albumina sérica bovina (BSA, de 1ug a 32ug) en buffer de salina fosfatos (PBS) que se utilizaron como estándar. Se agregaron 200ul del reactivo de Bradford a 800ul de estándares o muestras y se leyeron a una OD₅₉₅ usando un espectrofotómetro (GeneQuant pro UV/V, Amersham Pharmacia Biotech), el PBS sirvió como blanco.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas se separaron por electroforesis (PAGE) en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y 12% (Laemmli, 1970). Se utilizó el sistema de Protean II System (BioRad) utilizando separadores de 0.75mm. Los geles se corrieron a 15mA/gel durante 1h aproximadamente y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad, Cat. No. 1610400) o se incubaron en buffer de transferencia durante 5' para transferirlos a las membranas de nitrocelulosa.

Western blot

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa (MNC) utilizando la técnica de electrotransferencia descrita por Towbin y colaboradores (Towbin *et al.*, 1979), empleando una cámara de transferencia (Idea Scientific Company). La transferencia se realizó a temperatura ambiente, aplicando una corriente de 1 Amp durante 1h. Las MNC se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0.3%. Las diluciones de los sueros se preparon en este mismo buffer y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% de 5' cada uno antes de las incubaciones con el primer y segundo anticuerpos y previo a la adición del sustrato. Se utilizaron anticuerpos anti IgG de conejo acoplados a peroxidasa (Goat anti rabbit IgG (H+L) HRP; Zymed, Cat. No. 65-6120) se utilizaron a una dilución de 1:1000 en PBS y el revelado se realizó con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, Cat. No. D-5905). La reacción se detuvo con agua destilada y se realizaron varios lavados para eliminar la DAB.

PreadSORCIÓN de los sueros de conejo

Se crecieron bacterias XI-1Blue en medio LB durante toda la noche a 37°C y se lisaron durante 10' a 95°C en presencia del buffer muestra (Tris-HCl 50mM pH6.8, SDS al 2%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.1% y B-mercaptoetanol al 5%). El lisado de bacterias se separó por PAGE-SDS preparativo, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se sometió a la corriente. Después se separó la membrana del gel, éste se tiñó con azul de Coomassie R-250 para verificar que la transferencia fuera completa. La membrana de nitrocelulosa con el lisado de bacterias se cortó en tiras de 0.5 cm y se incubaron con los sueros anti-glicoproteínas para adsorber los anticuerpos anti-*E. coli*. Los sueros se incubaron con 16 tiras durante 30'. Se verificó con el western blot que los sueros ya no reaccionaran con el lisado de bacterias. Se utilizó suero de conejo preinmune como control.

Preparación de bacterias para el inmnotamizaje

Se inocularon 5ml de medio LB suplementado con maltosa al 0.4% y MgSO₄ 10mM con una colonia de bacterias XL-1 Blue. El cultivo se creció durante toda la noche a 37°C con agitación. Este cultivo se utilizó para la infección con la biblioteca de adulto como se describe a continuación.

Inmnotamizaje de la biblioteca de parásito adulto

Se utilizó el método de Sambrook y colaboradores con algunas modificaciones: 50,000 unidades formadoras de placa (pfu) se mezclaron con 600ul de bacterias XL-1 blue y se incubaron a 37°C durante 30'. Las bacterias infectadas con los fagos recombinantes se resuspendieron en 10 ml de top agar (7gr bacto agar/l de LB) suplementado con maltosa al 0.4% y MgSO₄ 10mM equilibrados a 55°C y se sembraron en cajas de Petri de 14 cm de diámetro que contenían LB agar al

15%. Las cajas se incubaron a 42°C durante 3 hrs, se cubrieron con membranas de nitrocelulosa (MNC, Schleicher & Schuell, Cat. 401147) previamente impregnadas con isopropyl-tio-B -D-galactosidasa (IPTG) 10mM y marcadas con tinta para identificar su posición, y se incubaron a 37°C durante 4 hrs. Se hicieron duplicados con otras MNC, se lavaron dos veces con buffer TNT (Tris-HCl 10mM pH 8.0, NaCl 150mM, Tween 20 al 0.05%) durante 30' con agitación y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS, Tween 20 al 0.3% y leche descremada al 5%) a temperatura ambiente durante 30' con agitación suave. Posteriormente las MNC se incubaron en 10 ml de un conjunto de sueros policlonales anti-glicoproteínas preadsorbido a una dilución 1:100 en el buffer de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Se siguió el protocolo de revelado de western blot. Las clonas positivas se aislaron con puntas estériles y se resuspendieron en 500ul de buffer SM (NaCl 100mM, MgSO₄ 8mM, Tris-HCl 50mM pH7.5, gelatina al 0.01%). Se agregaron 30ul de cloroformo para lisar las bacterias y se centrifugaron a 12,000g durante 5' a temperatura ambiente. Estas clonas se utilizaron para transfectar bacterias (10ul de una dilución 10⁻⁴) y hacer un segundo inmutotamizaje (Sambrook *et al.*, 1989).

Tamizaje por hibridación de DNA

La hibridación con DNA de la biblioteca de adulto se llevó a cabo con membranas de nylon Hybond-N (Amersham farmacia, Cat. No. RPN2020). Se utilizó el fragmento que codifica para calreticulina como sonda y se marcó con biotina con el método de "random priming" de Tropix (Tropix; Cat. No. AR100L). Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron a 65°C para asegurar el pegado específico de la sonda. Las membranas se incubaron durante 18-20 horas. Las clonas positivas se identificaron con el sistema de detección de quimioluminiscencia para DNA biotinilado utilizando CDP-star como sustrato

siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied BioSystems, Cat. No. ST100CB).

Secuenciación y análisis de DNA

Se recuperaron los fagémidos pBluescript de las clonas positivas por escisión *in vivo* permitiendo su caracterización en un sistema de plásmido como lo especifica el fabricante (Stratagene, Cat. No. 236211). Los plásmidos se purificaron utilizando un sistema de purificación de DNA Wizard Plus SV Minipreps siguiendo el protocolo que provee el fabricante (Promega, Cat. No. A1330). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador de DNA automático (Applied Biosystems Inc., modelo 310) utilizando un Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing System (Applied Biosystems Inc.). Para la secuenciación inicial se usaron los nucleótidos universales T3 y T7 (Gibco, BRL). Se diseñaron dos oligonucleótidos internos de la calreticulina para poder obtener la secuencia completa (Gibco BRL). Las secuencias se analizaron utilizando los algoritmos del BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov). La predicción de la secuencia señal se llevó a cabo con el programa SignalP (www.cbs.dtu.dk) y la alineación de la TsCRT con otras clareticulinas se realizó con el programa ClustalW (www.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl). En la tabla 2 se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de TsCRT:

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia
T3	5' TAATTGGGAGTGATTTC 3'
T7	5' AATACGACTCACTATAG 3'
Calret F	5' GGTCCCGATATTTGTGG 3'
Calret F2	5' GCCAAACAACCGGAGG 3'

PCR para la obtención de TsCRT con los sitios *Eco* RI

Se sintetizaron los oligonucleótidos con los sitios de restricción para *Eco* RI y su secuencia se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos con los sitios *Eco* RI.

Oligonucleótido	Secuencia
CRTF	5' ATATGAATTCGAAGTTTACTTCGAGGAC 3'
CRTR	5' ATATGAATTCCTACAATTCATCCTTCGAG 3'

Los oligonucleótidos se diseñaron para obtener la proteína madura sin el péptido señal. La clona que codifica para la TsCRT completa se utilizó como templado para la amplificación. La reacción se realizó en un volumen de 50ul (Tris-HCl 10mM pH8.3, KCl 50mM, MgCl₂, 2.5mM dNTPs 0.2mM, 50 pmoles de cada oligonucleótido y 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Expand High Fidelity PCR System, Roche Cat. No. 1732641). Se utilizó un termociclador (BioRad Gene Cycler). El programa que se utilizó para el PCR se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Programa para el PCR.

1X	Desnaturalización 2' a 95°C
25X	Desnaturalización 1' a 95°C
	Hibridación 1' a 56°C
	Extensión 1' a 72°C
1X	Extensión 10' a 72°C

Digestión enzimática del DNA

Para las digestiones del DNA con enzimas de restricción se usaron entre 1 y 5ug de plásmido y 1.5 unidades de la enzima *Eco* RI por ug de DNA. Las digestiones tanto del producto de PCR con los sitios *Eco* RI como la linearización del plásmido pET23-a se hicieron a 37°C durante toda la noche en el buffer React 3 que provee el fabricante (Gibco BRL Cat. No. 15202-013). El DNA digerido se

separó en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio al 0.5ug/ml. Los fragmentos digeridos se purificaron a partir de la agarosa utilizando el sistema de purificación de DNA Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Cat. No. A7170) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Construcción del vector de expresión pET 23-a-CRT

El fragmento de cDNA que codifica para la TsCRT madura digerido con *Eco* RI se clonó en el plásmido pET 23-a con resistencia a ampicilina (Novagen, 800-526-7319) linearizado con la misma enzima de restricción. Para la ligación, se utilizó 1u de T4 DNA ligasa (Gibco BRL, Cat. No. 15224-025) en buffer de ligación (Tris-HCl 250mM, pH 7.6, MgCl₂ 50mM, ATP 5mM, DTT 5mM y polietilenglicol al 25%). Se realizó una reacción de PCR utilizando el oligonucleótido T7 y CRTR para confirmar la orientación correcta del inserto.

Preparación y transformación de bacterias competentes

Se inocularon 5ml de medio LB con una colonia de bacterias y se incubaron durante 3h a 37°C hasta alcanzar una O.D.₆₀₀=0.6. Las células se centrifugaron, resuspendieron en CaCl₂ 50mM frío y se incubaron durante 30' en hielo. Transcurrido este tiempo, las bacterias se cosecharon y resuspendieron en 200ul de CaCl₂ 50mM, se dividieron en alícuotas y se guardaron a -70oC (Sambrook *et al.*, 1989). Para la transformación, 100ul de bacterias competentes se incubaron con 10ul de vector pET23-a-TsCRT en hielo durante 30'. Transcurrido este tiempo, se les dió un choque térmico a 42°C durante 30" y se incubaron en hielo 2' adicionales. Se les agregó 1 ml de medio LB y se agitaron a 250 rpm a 37°C durante 1h. Las bacterias transformadas se centrifugaron, resuspendieron en 40ul de medio LB y se sembraron en cajas Petri con LB-amp

(200mg/ml). Las bacterias se crecieron a 37°C durante toda la noche (Sambrook *et al.*, 1989). Se comprobó la presencia del vector por PCR.

Expresión y extracción de TsCRT recombinante (TsCRT_r)

El plásmido pET 23-a-CRT se transformó en bacterias XL-1 Blue competentes para obtener suficiente plásmido para la secuenciación y subsecuente transformación en un sistema de expresión. El plásmido se purificó utilizando un kit de Qiagen (Qiagen, Midi Prep Cat. No. 12145). Para la expresión de la TsCRT_r se transformaron bacterias BL21 competentes que son lisógenos del bacteriófago DE3 y contienen una copia del gene que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac UV5* que es inducible por IPTG. Las bacterias se sembraron en LB-ampicilina (200ug/ml) para seleccionar aquellas clonas que tuvieran el plásmido. Se picaron 5 clonas que se volvieron a plaquear en cajas con LB-amp y LB-amp-IPTG para seleccionar las clonas que expresan la CRT. Se escogió una de las clonas positivas, se cultivó durante 4 a 5 hrs y se guardó a 4°C toda la noche. Al día siguiente, este cultivo se utilizó para inocular matraces con 50 o 250 ml de LB-amp en una dilución de 1:100. Los cultivos se indujeron con 0.75mM IPTG al alcanzar una OD₆₀₀ de 0.8 a 0.9 y se crecieron durante 4 hrs más. Las bacterias se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% para identificar la TsCRT inducida, se colectaron por centrifugación y se guardaron a -20°C para la extracción de la CRT recombinante. Se utilizó el buffer A (Tris-HCl 20mM pH7.3, MOPS 10mM pH7, sacarosa al 20%) para lisar las células y extraer las proteínas solubles, el precipitado con las proteínas de membrana se resuspendió en buffer P (Tris-HCl 20mM, MOPS 10mM, leupeptina 1ug/ml, aprotinina 20ug/ml, fluoruo de fenilmetilsulfonida, PMSF 0.5mM) y se sonicó cuatro veces a 50 W durante 30", se le agregaron 1300U de RNAsaT1 y DNAsaI. El sonicado se centrifugó a 13,000g durante 30" y se corrieron 10ul de los sobrenadantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE para identificar la fracción que contenía la TsCRT_r.

Purificación de la TsCRTr por punto isoeléctrico

Se utilizó el programa ProtParam (www.expasy.ch/cgi-bin/protparam) para calcular el punto isoeléctrico de la TsCRTr que es de 4.39. Se agregó NaCl a una concentración final de 0.6M a la fracción que contenía la TsCRTr y se ajustó el pH a 4.39 con HCl 0.1N. Se agitó durante 1h a 4°C y se centrifugó durante 30' a 14,000 rpm. El precipitado se resuspendió en PBS pH 7.4 y se analizó por SDS-PAGE. La proteína se guardó en alícuotas a -20°C.

Ensayo de unión a $^{45}\text{Ca}^{++}$

En geles de poliacrilamida al 12% se corrieron muestras de 2.5 y 5ul de bacterias inducidas para expresar TsCRTr y se transfirieron a MNC. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau S para confirmar la transferencia, se destiñeron con PBS y se incubaron en imidazol 10mM pH 6.8, KCl₂ 60mM, MgCl₂ 5mM y 1uCi/ml $^{45}\text{CaCl}_2$ durante 10'. Se hizo un lavado con H₂O destilada de 5', se dejó secar sobre papel filtro y el Ca^{++} fijado se reveló utilizando una pantalla intensificadora (Molecular Dynamics, Cat. No. 63-0034-89) que se leyó en un "Personal Molecular Imager Fx" (BioRad Cat. No. 170-9400) (Maruyama *et al*, 1984).

RESULTADOS

Aislamiento de las clonas que codifican para TsCRT

Se utilizaron aproximadamente 2.5×10^5 pfu de la biblioteca de *T. solium* en lambda ZAPII de adulto para hacer el inmunotamizaje con suero hiperinmune de conejo específico contra las GP's. Se aislaron seis clonas positivas y se realizó un segundo tamizaje con 100 pfu por caja para confirmar los resultados. El vector lambda ZAPII permite la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript, facilitando la caracterización del inserto en un sistema de plásmido. Se dedujeron las secuencias polipeptídicas de las clonas y se analizaron usando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). De las seis clonas positivas, cinco codificaron para el antígeno paramiosina, que ya ha sido clonado y ampliamente estudiado (Laclette *et al.*, 1992; Landa *et al.*, 1993) y una clona codificó para TsCRT. Debido a que en esta clona no se encontró la región que codifica para el amino terminal de la proteína, se usó el inserto de la TsCRT marcado como sonda para hacer una hibridación de la biblioteca e identificar clonas completas que contengan el codón de iniciación. Se aislaron seis clonas positivas y se secuenciaron. Una de las clonas contenía el cDNA que codifica para la proteína completa con 1.3 kb y un marco de lectura de 395 aminoácidos. En la figura 2 se presenta la secuencia de nucleótidos que codifica para la TsCRT y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente. El codón de terminación está representado por un asterisco, hay seis nucleótidos en la región 5' no traducida y 132 nucleótidos en el extremo 3'. El codón de iniciación (ATG) empieza en la posición 1. La predicción de la secuencia señal se llevó a cabo con el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/>), esta se identificó entre los residuos 1 y 18, la proteína madura comienza en la posición 19 (E). La señal de retención del retículo endoplásmico (KDEL) está localizada justo antes del codón de terminación. Asimismo, el programa ScanProsite (Hoffmann, 1999; www.expasy.ch/cgi-bin/scanprosite) identificó dos secuencias consenso de la familia de las calreticulinas: la primera del residuo 74 al 94

(KhEQnidCGGGYVKLL) y la segunda del 111 al 119 (IMFGPDICG) ambas localizadas en las regiones conservadas del dominio N. Los dos conjuntos de tres repeticiones A (PxxIxDPDAxKPEDWDE) y B (GxWxPPxIxNPxYx) están presentes en el dominio C y están involucrados en la unión de alta afinidad a Ca^{++} (Michalak, 1999). Esta secuencia ha sido sometida al GenBank y se dió el número de acceso: AF340232.

Se utilizó el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) para obtener la alineación de la TsCRT con otras calreticulinas y los resultados se muestran en la figura 3. Los asteriscos (*) representan la identidad de aminoácidos, los (:) similitud fuerte y (.) similitud débil. TsCRT muestra 47.12%, 48.11%, 49.62%, y 49.16% de identidad con las calreticulinas de *S. japonicum* (AAC00515), *O. volvulus* (AAA59056) *S. mansoni* (Q06814), y la humana (P27797) respectivamente. TsCRT presenta dos sitios potenciales de glicosilación (ScanProsite), y al igual que otras calreticulinas tiene tres cisteínas, dos de ellas forman un puente disulfuro que parece ser importante para el doblamiento correcto del extremo N-terminal. Todas estas características claramente identifican a la TsCRT como miembro de la familia de las calreticulinas. La secuencia de la TsCRT, incluyendo el péptido señal que comprende hasta el aminoácido 18, fue sometida a un análisis de hidropaticidad por el método de Kyte y Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982), este se muestran en la figura 4. Los resultados indican que la proteína TsCRT es en general hidrofílica. Adicionalmente, se realizó el análisis de la composición de aminoácidos con el programa ProtScale (www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl). La TsCRT presenta un alto contenido de aminoácidos cargados negativamente, que contribuyen a la naturaleza ácida de la proteína (Tabla 5).

RESULTADOS

↓
proteína madura

```

-6      ggtatgatggctgttccctcgctttcttattgcatgttattcgttgtgaatcgcggtgctgaagttacttc
 1      M A V P A F L I A L L P V V N T R A E . I

67      gaggacaggtttattgagagcaacatcgataaagtgggaaaagtccaatatgacgaaagcaacttgggtctc
23      R D R F I P S N I D K W E F S F D E F M I S I

139     tgcgaaatgcaaaagccaagggtgatttcgatgataaagaagcgggtgggagagaacaacacaagatgcc
47      C E Y A A K F E G D F D D E E D C G M E T T Q D A

211     cggttttaccgttactcagcaccatttaataaaccttgtcaataaggacaaaatcatgtgtgcaattc
71      R F Y R Y R A V E N E P L F M E D F I E C Q D F

283     acggtaaagcagcagcaaaatattgactcgggtgggtacgtgaaattctcgggagaatctt;caaacca
95      T V K H E Q H I D C G G G Y C E I I E E E F E F E

355     gatgatttccatggcgaaagtccttatgagatcatggtttgggtccgcatattgtgggtatgacaagaaaatt
119     D D E F H G E A D M E I H E G P E C G Y D R E I

427     gtccaagttattttctcctataagggcaaaaattatcttgtgaaaagggatattccctgcaaatcggacaca
143     V E V I E T V E G P H Y L V I K A D I C F E D T

499     cttaccatttgtcacgcctcatcgtccgacctgataatcattcgaagtcttgattgataacaaaactgcc
167     I T H L Y T I I M I E D M I E F R M I I D N T A

571     gaaaccggtcgctcgttggcgacttcgatgatcccccaagaacaattgatgatcccgatgccaaaaaa
191     R E C D L A I G R L P R T I D D P D A K K

643     ccagaagattgggtagatgaggccgaaatcccgcaccagacgataagaakcctgatgactgggatcagccc
215     C A E D W V D E A E I P D P D K K P D D W D O P

715     aagactatcgtagatcagaatgcaaaacaaccggaggactggaacgaagaacagatggcgagtggacggcc
239     K T I V D T N A E Q P E D W N E E T D G E W T A

787     cccatgatagataaccccgattacaagggtgaatggcatcccaagatgatacacaacctgcctacagggga
263     . P M I D N P D Y K G E W H P K M I P N P A Y R G

859     gagtggaaaccgccacagattccaatccagaccacttggaggacagtgaactctatgctgcacaccttggct
287     . E W K P P O I P N P D H F E D S E L Y A R T F A

931     tacattggctcttgatctctggcaggtgaaatctgggacgattttcgacaactttatcgtttcagacaatga
311     Y I G L D L W Q V F S G T I F D N F I V S D N V

1003    tccgagtgtcaagctcacgccgagtactggcaaaaacgatttgcatttgaggaggaggaagagaagaagat
335     S E C Q A H A E Y W Q K P F A F E E R E E K K S

1075    tttgaggagaaggataaagaaatctccaccaccgataatgtaccagacgagatgaggacgaggaagtggat
359     F E E F D E E S S T T D N V P D E S E D E E V D

1147    ctcgaggaaggaggtgatgcttctcgaaggatgaattgtatgttggcttgatttccctttgtatattggc
383     L E E G C D A S S K D E L

1219    atgcgatttacttcaatgctaaatggatctgtggttaccattgccaccgatgtgttatcctttgtcgaa
1291    cggtctcatgatcgcggaagtaaaaaatcttggtttaaaaaaaaaaaaaa
  
```

Figura 2. Secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la CRT de *T. solium* y la correspondiente secuencia de aminoácidos en marco abierto de lectura. Las secuencias consenso están enmarcadas en los recuadros. El dominio N está representado en azul, el dominio P, en rojo, y el dominio C en verde. Los dos conjuntos de tres repeticiones están subrayados, A () y B (). La secuencia del péptido señal está en cursivas y la señal de retención de retículo endoplásmico en negritas.

RESULTADOS

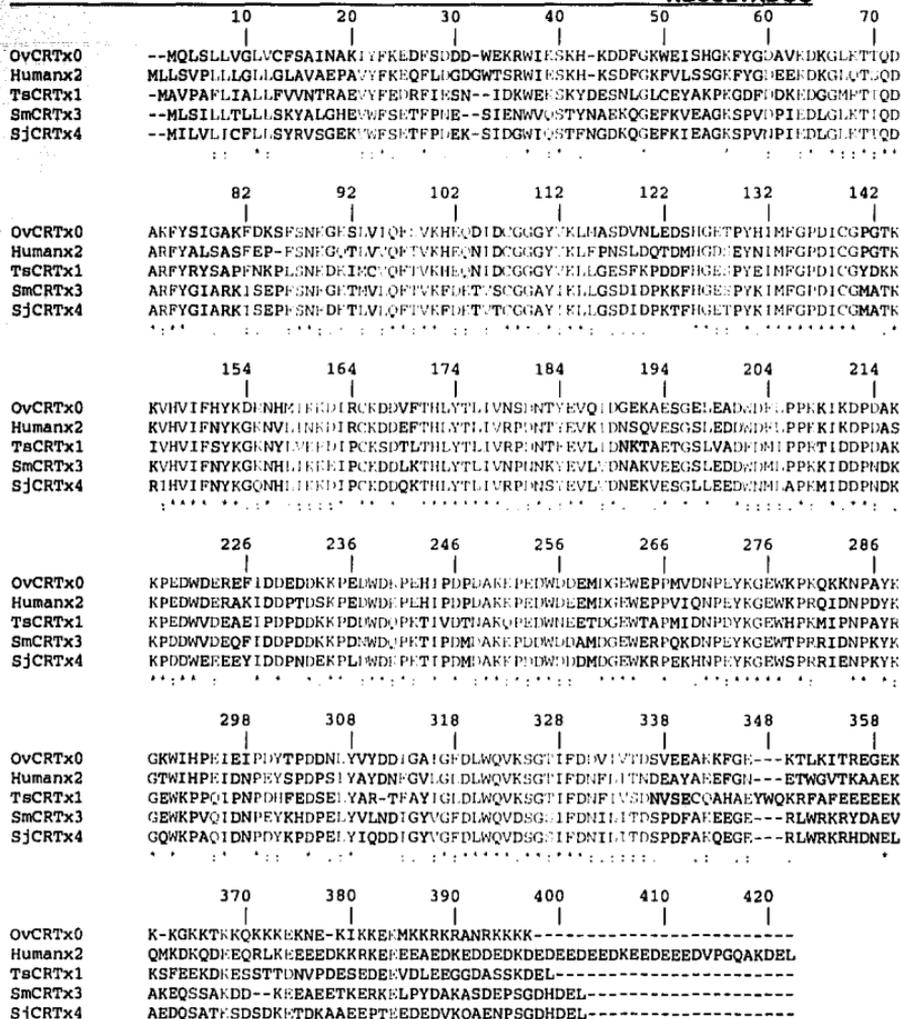


Figura 3. Alineamiento de las secuencias deducidas de diferentes CRT usando el programa ClustalW. Human, CRT de humano; OVRAL1, RAL-1 antigen de *O. volvulus*; SmCRT, CRT de *S. mansoni*; SjCRT, CRT de *S. japonicum*; TsCRT, CRT de *T. solium*. Los sitios potenciales de glicosilación se muestran en los recuadros amarillos. Los asteriscos (*) representan identidad de aminoácidos, los (:) fuerte similitud y (.) similitud débil.

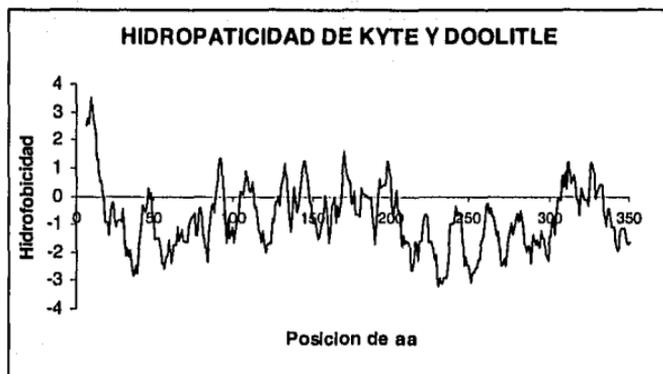


Figura 4. A) Análisis de hidropaticidad por el método de Kyte y Doolittle de la secuencia deducida de la TsCRT.

Tabla 5. Composición de aminoácidos:

Ala (A)	20	5.1%;	Leu (L)	19	4.8%
Arg (R)	11	2.8%;	Lys (K)	35	8.9%
Asn (N)	17	4.3%;	Met (M)	7	1.8%
Asp (D)	48	12.2%;	Phe (F)	21	5.3%
Cys (C)	6	1.5%;	Pro (P)	28	7.1%
Gln (Q)	9	2.3%;	Ser (S)	20	5.1%
Glu (E)	41	10.4%;	Thr (T)	19	4.8%
Gly (G)	20	5.1%;	Trp (W)	9	2.3%
His (H)	7	1.8%;	Tyr (Y)	16	4.1%
Ile (I)	22	5.6%;	Val (V)	20	5.1%

Total de aminoácidos cargados negativamente (Asp + Glu): 89

Total de aminoácidos cargados positivamente (Arg + Lys): 46

Clonación y expresión de TsCRT

El fragmento que codifica para la TsCRT se clonó sin la región que codifica para el péptido señal en el vector pET23-a en el sitio *Eco* RI. La figura 5 muestra el mapa del plásmido y el sitio de inserción. Se transformaron bacterias XL-1 Blue y se picaron 10 colonias positivas que se sometieron a PCR con los oligonucleótidos CRTF y CRTR para confirmar que el plásmido tuviera el inserto. Cinco clones amplificaron el fragmento de 1300pb, de éstas solamente una amplificó cuando se utilizaron los oligonucleótidos T7 y CRTR lo que permitió seleccionar la clona con la orientación correcta (Fig. 6).

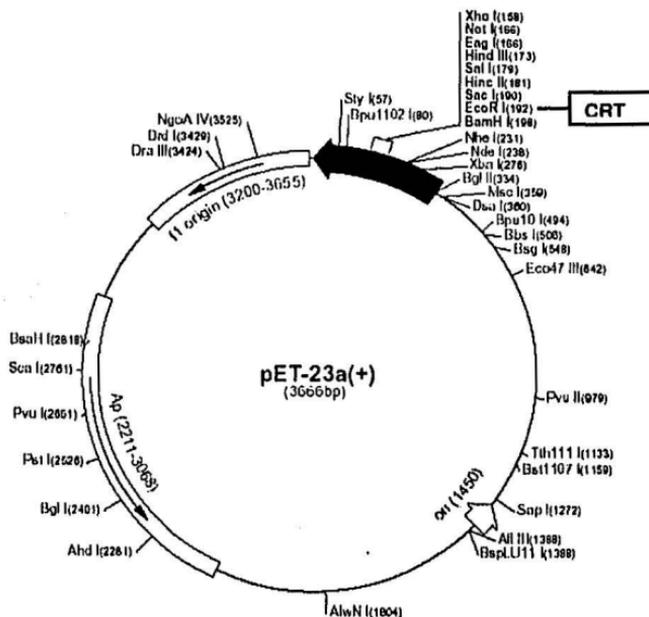


Figura 5. Mapa de pET23-a mostrando el sitio de inserción del fragmento que codifica para TsCRT en el sitio *Eco* RI.



Figura 6. Análisis por PCR de las colonias transformadas con pET23-a-TsCRT con los oligonucleótidos T7 y CRTR para seleccionar la orientación correcta del inserto. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio al 0.5%. Pesos moleculares (PM), control positivo (6), colonias transformadas (1-5).

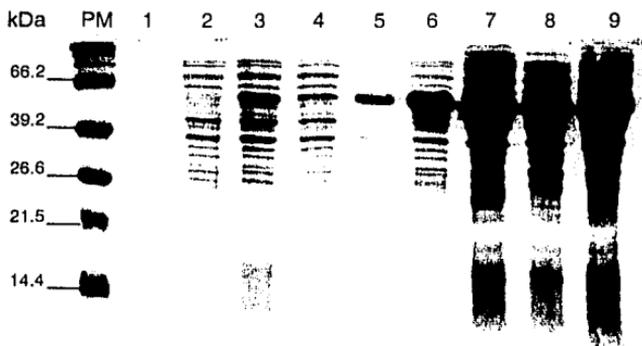


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de TsCRT. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al 12% y se tiñó con azul de Coomassie R-250. Proteína total de 5 colonias de bacterias BL21 transformadas con el plásmido recombinante pET23-a-TsCRT previos a la inducción (carriles 1-4) y después de 4h de inducción con 0.75mM IPTG (carriles 5-9). Pesos moleculares (PM).

Para la expresión de la TsCRTr se transformaron bacterias BL21 con el plásmido pET23a-CRT. Se aislaron 5 clones y se indujeron con IPTG. Los resultados de la expresión se presentan en la figura 7. La TsCRTr representa el componente principal del extracto de bacterias. Una de las clones se escogió para expresión en gran escala de la proteína recombinante (carril 6). La proteína tiene un peso molecular aparente aproximado de 50 kDa, esta movilidad no corresponde exactamente al peso molecular teórico calculado de 45.3 kDa por el programa ProtParam. La movilidad ligeramente diferente de la calreticulina ya ha sido reportada tanto en proteínas nativas como recombinantes (Baksh, 1991; Krause *et al*, 1990; Milner *et al*, 1991). La figura 8 muestra la electroforesis de la clona que expresa TsCRTr inducida a diferentes densidades ópticas. Cuando las bacterias fueron inducidas a una OD₆₀₀ de 0.3 no hubo expresión de la proteína recombinante (carril 2), mientras que la inducción a una OD₆₀₀ de 0.9 fue produjó una expresión del ~33% de la proteína total de las bacterias (carril 3) calculado por densitometría utilizando el programa Quantity One 4.0.3 (BioRad, 170-8625). La inducción de las bacterias transformadas se llevó a cabo a esta densidad óptica en los experimentos subsecuentes. La mayor parte de la proteína se expresó en la fracción no soluble, se logró extraer casi en su totalidad por sonicación sin necesidad de recurrir a los procedimientos de desnaturalización. Estos resultados sugieren que la proteína se encuentra en la fracción membranal del lisado de bacterias (Figura 9).

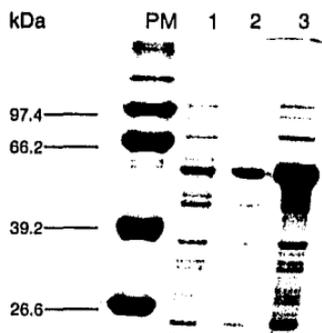


Fig. 8. Inducción de la clona que expresa TsCRTr. Los lisados de bacterias transformadas se indujeron con IPTG a dos densidades ópticas: 0.3 (carril 2) y 0.9 (carril 3), y se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%. En el carril 1 se corrió un lisado no inducido. Pesos moleculares (PM).

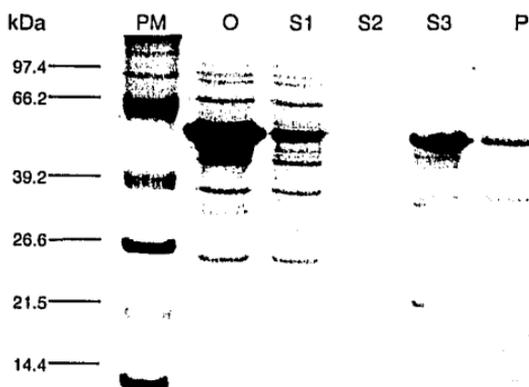


Figura 9. Extracción de la TsCRTr. El cultivo de bacterias (O) se lisó con un buffer de sacarosa y se hicieron centrifugaciones diferenciales. Las fracciones solubles (S1, S2) la fracción no soluble sonicada para extraer las proteínas de membrana (S3) y el precipitado (P) resuspendido para visualizar la eficiencia de la extracción, se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida al 12%. Pesos moleculares (PM).

Purificación por punto isoeléctrico de la TsCRTr

Aunque el vector pET23-a permite la expresión de proteínas con un dominio de polihistidinas que hace más fácil su purificación por cromatografía de afinidad, el fragmento que codifica para la TsCRTr contiene el codón de terminación TAG por lo que la proteína recombinante se expresó sin las histidinas. Sin embargo, los altos niveles de expresión de la proteína recombinante, permiten su purificación por medio de métodos convencionales. Como primer paso en la purificación de la TsCRTr se recurrió a la precipitación por punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico de la TsCRTr se calculó con el programa Protparam y resultó ser de 4.39. A este pH la calreticulina no presenta una carga eléctrica neta, no hay repulsión entre las moléculas y precipita. Los resultados de la precipitación por punto isoeléctrico se presentan en la figura 10. Se analizaron cuatro concentraciones de proteína que se determinaron por el método de Bradford. Se utilizó el mismo programa de densitometría Quantity One 4.0.3 para calcular el porcentaje de pureza de la TsCRTr que resultó ser del ~80%.



Figura 10. Análisis por SDS-PAGE de la precipitación por punto isoeléctrico de la TsCRTr. La TsCRTr se separó en un gel al 10%. Se aplicaron diferentes concentraciones de la proteína: 14ug (carril 1), 28ug (carril 2), 42ug (carril 3) y 56ug (carril 4). Pesos moleculares (PM).

Ensayos de unión a $^{45}\text{Ca}^{++}$.

Para determinar si la TsCRTr se expresa como una proteína funcional se realizó un ensayo de unión a Ca^{++} . Los resultados muestran que la TsCRTr une $^{45}\text{Ca}^{++}$. Se analizaron dos concentraciones del extracto de bacterias transformadas con pET23-a-TsCRT e inducidas con IPTG, que se sometieron a SDS-PAGE y transferencia a MNC. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau S antes de la incubación con $^{45}\text{Ca}^{++}$ (datos no mostrados). El componente principal que corresponde a la TsCRTr inducida fue detectado por el $^{45}\text{Ca}^{++}$, sugiriendo que la TsCRTr se expresa en su conformación funcional. Los pesos moleculares sirvieron como controles negativos del ensayo y un fragmento de una proteína recombinante que une Ca^{++} de la familia de las proteínas con brazos EF clonada en el laboratorio del Dr. Laclette sirvió como control positivo (Fig. 11).

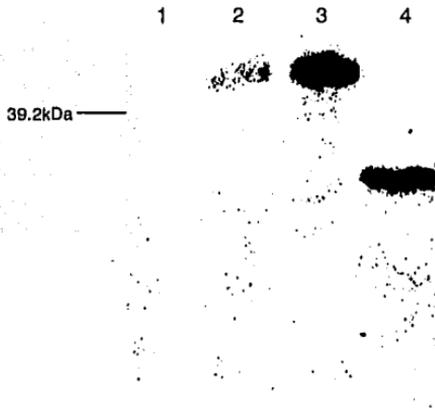


Figura 11. Ensayo de unión a $^{45}\text{Ca}^{++}$ de un extracto de bacterias que expresa TsCRTr. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con $1\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ de $^{45}\text{CaCl}_2$. Las MNC se tiñeron con rojo de ponceau S para determinar la eficiencia de transferencia y la posición de los pesos moleculares. Carril 1, pesos moleculares que sirvieron como control negativo, carril 2, 2.5µl de extracto inducido, carril 3, 5µl; carril 4 control positivo. Se indica la posición de los pesos moleculares.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se reporta por primera vez la caracterización de la CRT de *T. solium*. El estudio de esta proteína, su caracterización y subsecuente localización es importante para dilucidar sus funciones específicas en el parásito y en la relación con el hospedero. Las características estructurales y la secuencia conservada, así como la habilidad de unir calcio, indican que la TsCRTr que se aisló, caracterizó y purificó parcialmente, pertenece a la familia de las calreticulinas.

Se analizó la secuencia deducida de aminoácidos y se identificaron varias secuencias características: (i) Dos secuencias consenso en el dominio N, (ii) dos conjuntos de tres repeticiones A y B en el dominio P, (iii) la presencia de una secuencia hidrofóbica en el extremo N-terminal que representa al péptido señal para su exportación y (iv) el tetrapéptido KDEL que representa una secuencia de retención de retículo endoplásmico (RE) en el extremo carboxilo del dominio C.

La TsCRTr contiene el tetrapéptido KDEL al igual que la CRT humana, y en contraste con las calreticulinas de *S. mansoni* y *S. japonicum* que presentan la secuencia HDEL (Scott and McManus, 1999; Khalife *et al.*, 1993), o la secuencia de *O. volvulus*, que aunque no presenta una señal de retención es claramente un homólogo de CRT (Unnasch *et al.*, 1988). A pesar de terminar con esta secuencia de retención, como otras proteínas de RE, (Pelham, 1996) se ha descrito la presencia de CRT en la superficie celular (Arosa *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999). Esto se puede deber a que al haber una sobreproducción de proteínas chaperonas, los receptores para el tetrapéptido KDEL disponibles no sean suficientes y que éstas escapen a la superficie. Por ejemplo, la CRT de conejo expresada en el sistema de levadura *Pichia pastoris* es secretada al medio a pesar de tener la secuencia de retención de RE (Andrin *et al.*, 2000). Otro mecanismo que podría explicar este fenómeno es la falta de accesibilidad de la secuencia de retención debido a la interacción con otras proteínas (Xiao *et al.*, 1999a). Por otro lado, Baksh y Michalak (1991) observaron que la señal de

retención en otras proteínas siempre esta precedida por grupos de aminoácidos ácidos como los del dominio C y sugirieron que las interacciones entre estas proteínas, incluyendo CRT y sus receptores, está regulada por Ca^{++} . La presencia de la TsCRT en la superficie del parásito podría tener implicaciones importantes en la interface hospedero-parásito, en los mecanismos de evasión immune y en el mantenimiento de la infección. así como en la generación de inmunidad protectora, por lo que se sugiere la realización de experimentos de inmunolocalización de la proteína nativa, así como de expresión, en las diferentes etapas de desarrollo del parásito.

Todas las CRTs hasta ahora estudiadas tienen tres cisteínas localizadas en el dominio N. La posición de estas cisteínas se conserva en todas las calreticulinas desde plantas hasta la CRT humana, dos de ellas forman un puente disulfuro que es importante para el correcto doblamiento de la región N terminal de la proteína (Michalak *et al.*, 1999). La TsCRT presenta estas tres cisteínas conservadas sugiriendo que la proteína recombinante es capaz de adquirir la conformación correcta. Esta característica es importante ya que el dominio N es el que une Zn^{++} a través de las histidinas (Baksh; *et al.*, 1995a Baksh *et al.*, 1995b). La unión de la calreticulina humana a Zn^{++} involucra cinco de las siete histidinas presentes en la secuencia. La TsCRT al igual que su homóloga de seres humanos, presenta siete histidinas, cuatro de las cuales se encuentran en el dominio N en posiciones conservadas, sugiriendo que podrían tener un papel importante en la interacción con dicho catión. Se ha demostrado que el Zn^{++} contribuye en la regulación de la expresión génica (Berg, 1990) en el funcionamiento de algunas metaloenzimas (Coleman, 1992), bloquea el flujo de Ca^{++} en algunas células (Hide, 1992) e induce apoptosis en linfocitos periféricos (Treves, *et al.*, 1994). Adicionalmente se ha demostrado que la CRT, como chaperona, interacciona con otras proteínas residentes de RE de manera dependiente de Zn^{++} , y que estas interacciones modifican su capacidad de unión a Ca^{++} . Existe una compartimentalización de las concentraciones de Zn^{++} en la

célula y ésta coincide con la presencia de CRT, por lo que se sugiere un papel regulador de esta proteína en los niveles intracelulares de este ion.

En el presente trabajo se demostró que la TsCRT presenta un alto grado de identidad con las secuencias de otras calreticulinas, incluyendo la humana (49.16%), la de *S. mansoni* (49.62%), la de *O. volvulus* (48.11%) y la de *S. japonicum* (47.12%). El alto grado de conservación de la calreticulina en las diferentes células eucariotas indica que se trata de una proteína fundamental para la fisiología celular.

El reconocimiento por parte del suero anti-glicoproteínas de *T. solium* de la TsCRT se puede explicar de manera no excluyente por: (i) la copurificación de la TsCRT con las glicoproteínas debido a su carácter de lectina que reconoce polipéptidos N-glicosilados (Helenius, 1997; Johnson, 2001) y (ii) el hecho de que la TsCRT sea una glicoproteína. Se tiene evidencia que las CRT de las diferentes especies presentan sitios potenciales de glicosilación que son utilizados de manera específica según el tejido o la especie (Nakhasi *et al.*, 1999; Michalak *et al.*, 1999). Más aún, se ha reportado que el choque térmico puede inducir la glicosilación de la CRT (Jethmalani y Henle, 1998; Michalak *et al.*, 1999). Aunque la glicosilación de la CRT es más común en plantas, se ha reportado CRT glicosilada en *Leishmania donovani* (Joshi, *et al.*, 1996). La TsCRT presenta dos sitios potenciales de glicosilación, uno en el dominio N y otro en el dominio C, al igual que la CRT humana, por lo que, en forma natural, pudo estar glicosilada, y por lo tanto fue purificada en el paso por la columna de lentil lectina que se utiliza para la obtención de las glicoproteínas diagnósticas (Tsang *et al.*, 1989). No deja de llamar la atención, el hecho de que en el presente trabajo, el suero generado en contra de las glicoproteínas diagnósticas utilizado para el inmunotamizaje, identificó, junto con la clona que codifica para la TsCRT, cinco clonas que codifican para paramiosina lo que sugiere que podría tratarse de proteínas que aunque no presentan alta homología a nivel de secuencia, presentan estructuras secundarias similares que les permiten interactuar con las mismas proteínas. La CRT de diversas células se une a la

región de colágena de C1q al igual que la paramiosina e inhiben la cascada de complemento (Stuart *et al.*, 1997; Eggleton *et al.*, 1998; Lacleite *et al.*, 1992). Por otro lado, la secuencia de la paramiosina de *T. solium* también presenta un sitio potencial de glicosilación en la posición 556-559.

La expresión de la TsCRTr en el sistema pET23-a-BL21 fue muy eficiente, ya que la proteína recombinante representa un ~33% de la proteína total expresada en el cultivo de bacterias. La TsCRTr expresada migró en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS en condiciones reductoras con un peso molecular relativo de 50 kDa. El peso molecular predicho por el programa ProtParam es de 45.3 kDa. Estas diferencias han sido documentadas en los casos de las calreticulinas humana, de *S. mansoni* y de *S. japonicum* (Huggins *et al.*, 1995; McCauliffe *et al.*, 1990), así como en el caso de calnexina, una molécula chaperona homóloga de la CRT que forma parte integral de la membrana de RE (Rajagopalan *et al.*, 1994) y calmegina, una proteína que une Ca^{++} y que se expresa durante la espermatogénesis (Watanabe *et al.*, 1994). La migración lenta de estas proteínas ha sido explicada por su naturaleza ácida, que interfiere con la unión al SDS. Esta sugerencia se basa en la observación de que la CRT de *O. volvulus* que no es tan ácida como otros miembros de esta familia, aparentemente migra con un tamaño similar al de la predicción de su peso molecular (Unnasch, 1988). La naturaleza ácida de la TsCRTr está dada por el alto porcentaje de ácido glutámico y aspártico principalmente en el dominio C y está relacionada directamente con la alta capacidad de las CRTs de unir a Ca^{++} . Esta región de la proteína es la que une Ca^{++} con alta capacidad y baja afinidad (Baksh y Michalak, 1991) y se ha demostrado que es esencial para mantener las reservas de Ca^{++} en el RE (Nakamura *et al.*, 2001). Estas regiones ricas en aminoácidos ácidos han sido descritas para otras proteínas que unen Ca^{++} , como calsecuestrina en músculo esquelético y cardiaco (Fliegel *et al.*, 1987) y el receptor de rianodina, que es un canal de Ca^{++} presente en la membrana del retículo sarcoplásmico (Takeshima *et al.*, 1989).

Se logró una purificación del 80% con la precipitación por punto isoeléctrico, aunque se necesitan pasos adicionales en el protocolo de purificación para obtener la TsCRTr con un grado de pureza mayor. Se ha demostrado que la interacción con Zn^{2+} induce un cambio conformacional en la CRT humana que expone los residuos hidrofóbicos que interactúan con fenil sefarsa en cromatografía de interacción hidrofóbica (Heilmann, *et al.*, 1993). Debido a que la proteína recombinante constituye un alto porcentaje de la proteína total, el uso de métodos convencionales como la cromatografía de intercambio iónico también han sido utilizadas exitosamente (Baksh *et al.*, 1991). Asimismo, la alta afinidad de unión a Ca^{2+} se podría explotar utilizando cromatografía de afinidad con una columna de ácido iminodiacético, quelante de iones metálicos divalentes (HiTrap affinity columns, Amersham Pharmacia). En el presente trabajo se demostró que la TsCRTr es capaz de unir Ca^{2+} , esto implica una conformación correcta y funcional de la proteína recombinante. Recientemente se ha identificado la CRT como un alérgeno en el nemátodo *Necator americanus*, sin embargo la proteína recombinante reportada no fue capaz de unir Ca^{2+} , probablemente debido a un incorrecto doblamiento de la molécula (Kasper *et al.*, 2001).

Es importante investigar otras funciones características de las CRTs, en particular, la capacidad de la TsCRTr de unir e inhibir el componente C1q de la cascada de complemento. Esta función es importante, ya que se tiene evidencia de que la vía clásica de complemento está involucrada en la destrucción de las oncósferas de *T. solium* (White *et al.*, 1997). Asimismo se ha sugerido que el parásito ha desarrollado mecanismos de evasión entre los que destaca el papel de la paramiosina ya que se une al componente C1q e inhibe la cascada del complemento (Laclette *et al.*, 1992). La TsCRTr también podría estar involucrada en estos mecanismos. Se le han atribuido una diversidad de funciones a la CRT, que podrían tener implicaciones importantes en la relación hospedero-parásito y desarrollo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. La calreticulina de *Taenia solium* (TsCRTr) presenta una estructura característica de la familia de las calreticulinas:

- Péptido señal.
- Tres dominios estructurales: dominio N, dominio P y dominio C.
- Dos secuencias consenso en el dominio N.
- Conservación de tres cisteínas y 5 histidinas en el dominio N, involucradas en la unión a Zn^{++} .
- Dos conjuntos de tres repeticiones A y B en el dominio P involucradas en la unión a Ca^{++} con alta afinidad.
- Señal de retención de retículo endoplásmico (KDEL).

2. La TsCRTr se expresa en *Escherichia coli* como una proteína funcional, ya que es capaz de unir Ca^{++} .

3. La TsCRTr se obtuvo con un grado de pureza del ~80% por precipitación por punto isoeléctrico.

4. Presenta ~50% de identidad con las calreticulinas de *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca volvulus* y *Homo sapiens*.

PERSPECTIVAS

1. Purificar completamente la TsCRTr.
2. Generar anticuerpos policlonales e inmunolocalizar la proteína TsCRT en las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito.
3. Analizar la expresión diferencial de la TsCRT en los diferentes estadios de desarrollo de *T. solium*.
4. Determinar su capacidad de unión al componente C1q e inhibición de la cascada de complemento.
5. Determinar el reconocimiento de TsCRT por sueros de pacientes con neurocisticercosis y con teniosis.
6. Determinar su utilidad como antígeno protector.

REFERENCIAS

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.

Aluja, A.S. and Vargas, G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* **28**: 65

Andrin, Ch., Corbett, E.F., Johnson, S., Dabrowska, M., Campbell, I.D., Eggleton, P., Opas, M., Michalak, M. 2000. Expression and purification of mammalian calreticulin in *Pichia pastoris*. *Pot Exp Purif.* **20**: 207-215.

Arosa, F.A., de Jesus, O., Porto, G., Carmo, A.M, and Sousa, M. 1999. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem.* **274**: 16917-16922.

Arrechevaleta, F., Molinari, J.L., and Tato P. 1998. A *Taenia solium* metacystode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* **84**: 117-122.

Baksh, S. and Michalak, M. 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca⁺ binding domains. *J of Biol Chem.* **266**: 21458-21465.

Baksh, S., Burns, K., Andrin, C, Michalak, M. 1995a. Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase. *J Biol Chem.* **270**: 31338-31348.

Baksh, S., Spamer, C., Heilmann, C., Michalak, M. 1995b. Identification of the Zn²⁺ binding region in calreticulin. *FEBS Lett.* **376**: 53-57.

Berg, J.M. 1990. Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for the interactions between macromolecules. *J Biol Chem.* **265**: 6513-6516.

Bouvier, M. and Stafford, W.F. 2000. Probing the three-dimensional structure of human calreticulin. *Biochem* **39**: 149590-14959.

Bradford, M.N. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.

Coleman, J.E. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem.* **61**: 897-946.

Corbett, E.F. and Michalak, M. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *TIBS* **25**: 307-311.

Corbett, E.F., Michalak, K.M., Oikawa, K., Johnson, S., Campbell, I.D., Eggleton, P., Kay, C., Michalak, M. 2000. *J Biol Chem*. **275**: 27177-27185.

Eggleton, P., Reid, K.B.M., Tenner, A.J. 1998. C1q-how many functions? How many receptors? *Trends Cell Biol*. **8**: 428-431.

Eggleton, P., Ward, F.J., Johnson, S., Khamashta, M.A., Hughes, G.R., Hajela, V.A., Michalak, M., Corbett, E.F., Staines, N.A., AND Reid, K.B. 2000. Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol* **120**: 384-391.

Ellgard, L. and Helenius, A. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 431-437.

Fliegel, L., Onhishi, M., Carpenter, M.R., Khanna, V.K., Reithmeier, R.A.F., MacLennan, D.H. 1987. Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* **84**: 1167-1171.

Flisser A. 2002. Parasitic Zoonoses. Chapter 4. Larval tapeworm infections: cysticercosis, cystic echinococcosis, and alveolar echinococcosis. In D.J. Richardson, and P.J. Krause (eds.), *North American Parasitic Zoonoses*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, p. 57-71.

Flisser, A. 1994. Taeniasis and cysticercosis due to *T. Solium*. In *Progress in clinical parasitology*, S. Tsieh (ed.). CRC Press Inc., New York, New York, p.77-116.

García, R.R., Medina F.Y., and Correa, B.D. 1998. Anticuerpos monoclonales contra la fase adulta de *Taenia solium*. XIII Congreso Nacional de Parasitología p.94

García-Domínguez, C. 1993. Tesis: Isolation and characterization of recombinant antigens from *Taenia solium*.

Hammerberg, B. and Williams, J.F. 1978. Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. *J Immunol* **120**: 1033-1037.

Heilmann, C., Spamer, C., Lebere, E., Gerok, W., Michalak, M. 1993. Human liver calreticulin: Characterization and Zn²⁺ dependent interaction with phenyl-sepharose. *Biochem Biophys Res Comm*. **193**: 611-616.

- Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N., Simmons, J.F. 1997. Calnexin, calreticulin and the foldin of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* 7: 193-200.
- Hide, M. and Beaven, M.A. 1991. Calcium influx in a rat mast cell (RBL-2H3) line. Use of multivalent metal ions to define its characteristics and role in exocytosis. *J Biol Chem.* 266: 15221-15229.
- High, S., Lecomte, F.J., Russel, S.J., Abell, B.M., and Oliver, J.D. 2000. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett* 476: 38-41.
- Hofmann K., Bucher P., Falquet L., Bairoch A. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:215-219.
- Hooker C.W. and Brindley, P.J. 1999. Cloning of a cDNA encoding SjlrV1, a *Schistosoma japonicum* calcium-binding protein similar to calnexin, and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1429: 331-341.
- Huggins, M.C., Gibbs, J., Moloney, N.A. 1995. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulin. *Mol Biochem Parasitol.* 71: 81-87.
- Jethmalani, S.M. and Henle, K.J. 1998. Calreticulin associates with stress proteins: implications for chaperone function during heat stress. *J Cell Biochem.* 69:30-43.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., and Eggleton, P. 2001. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 11: 122-129.
- Joshi, *et al.*, 1996. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol.* 81: 53-64.
- Kasper, G., Brown, A., Eberl, M., Laurent, V., Kieffer, N., Berry, C., Girdwood, K., Eggleton, P., Quinell, R., and Pritchard, D.I. 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signaling domains of some integrins. *Parasite Immunol* 23: 141-152.
- Khalife J., Liu, J.I., Pierce, E., Porchet E., Godin, C., and Capron, A. 1994. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology* 108: 527-532.

Khalife, J., Pierce, R., Pochet, E., Godin, C., and Capron, A. 1993. Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol Biochem Parasitol.* **62**: 313-316.

Kovacs, H., Campbell, I.D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F.J., Reid, K.B., and Eggleton, P. 1998. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin gamma motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochem* **37**: 17865-17874.

Krause, K.H., Simmerman, H.K.B., Jones, L.R., and Campbell, K. 1990. Sequence similarity of calreticulin with a Ca²⁺(+)-binding protein that co-purifies with an Ins(1,4,5)P₃-sensitive Ca²⁺ store in HL-60 cells. *Biochem. J* **270**: 545-548.

Labriola, C., Cazzulo, and Parodi, A.J. 1999. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglycosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. *Mol Biol Cell* **10**: 1381-1394.

Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., and Nicholson-Weller, A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* **148**: 124-128.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landa, A., Laclette, J.P., Nicholson-Weller, A., Shoemaker, C.B. 1993. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol.* **60**: 343-348.

Leid, R.W., Grant, R.F., Suquet, C.M. 1987. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol.* **7**: 1349-53.

Lethbridge, R.C. 1980. The biology of the oncosphere of cyclophyllidean cestodes. *Heminthol Abs.* **49**: 59-72.

Marcelain, K., Colombo, A., Molina, M.C., Ferreira, L., Lorca, M., Aguillon, J.C., and Ferreira, A. 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica* **75**: 291-300.

Maruyama, K., Mikawa, T., and Ebashi, S. 1984. Detection of Ca²⁺ binding proteins by ⁴⁵Ca²⁺ autoradiography on nitrocellulose membranes after SDS gel electrophoresis. *J Biochem.* **95**: 511-519.

McCauliffe, D.P., Lux, F.A., Lieu, T.S. et al. 1990. Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J Clin Invest.* **85**: 1379-1391.

Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause K-H., Opas, M., MacLennan, D.H., Michalak, M. 1999. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* **144**: 857-868.

Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., and Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **344**: 281-292.

Milner, R.E., Baksh, S., Shemanko, C., Carpenter, M.R., Smillie, L., Vance, J.E., Opas, M., and Michalak, M. 1991. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **266**: 7155-7165.

Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., and Leon-Cazares, J.M. 1990. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann Trop Med Parasitol.* **84**: 205-208.

Naglaa, E.G., El Ridi, R., Tawab, N.A., El Demellawy, M., and Mangold, B.L. 2000. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccines T-cell antigen and characterized as calreticulin. *J Parasitol.* **86**: 993-1000.

Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Prys, J.B., Muller-Esterl, W., Lew, D.P., Krause, K.H., Demareux, N., Opas, M., and Michalak, M. 2001. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol.* **154**: 12

Nakhasi, H.L., Pogue, G.P., Duncan, R.C., Joshi, M., Atreya, C.D., Lee, N.S., and Dwyer, D.M. 1998. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol Today.* **14**: 157-159.

Pelham, H.R. 1996. The dynamic organization of the secretory pathway. *Cell Struct Funct.* **21**: 413-419.

Plancarte, A., Hirota, C., Martinez-Ocana, G., Mendoza-Hernandez, G., Zenteno, E., Flisser, A. 1999. Characterization of Gp39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. *Parasitol Res.* **85**: 680-684.

Rabiela, M.T., Hornelas, Y., Garcia-Allan, C., Rodriguez-del-Rosal, E., Flisser, A. 2000. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: A histological and electron microscopy study. *Arch Med Res.* **31**: 605-607.

- Rabiela, M.T., Rivas, A., and Flisser, A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Today* 5: 357-359.
- Rajagopalan, S., Xu, Y., Brenner, M.B. 1994. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 263: 387-390.
- Ribeiro de Jesus, A., Araujo, I., Bacellar, O., Magalhaes, A., Pearce, E., Harn, D., Strand, M., and Carvalho, E.M. 2000. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infect Immunol* 68: 2797-2803.
- Rokeach, L.A., Zimmerman, P.A., and Unnasch, T.R. 1994. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect Immun* 62: 3696-3704.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor (New York).
- Sarti, E. 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Publica Mex* 39: 225-231.
- Scott, J.C. and McManus, D.P. 1999. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the major endoplasmic reticulum-associated calcium-binding protein, calreticulin, from Philippine strain *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 48: 35-46.
- Silverman, P.H. 1954. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova and some criteria on their viability. *Am Trop Med Parasit.* 48: 206-215.
- Slais, J. 1973. Functional morphology of cestodes larvae. *Adv Parasitol.* 11: 396-480.
- Takehima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., Numa, S. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445.
- Tato, P., Castro, A.M., Rodriguez, D., Soto, R., Arechavaleta, F., and Molinari, J.L. 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacystodes. *Parasitol Res* 81: 181-187.
- Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA*. **76**: 4350-4354.

Treves, S., Trentini, P.L., Ascanelli, M., Bucci, G., diVirgilio, F. 1994. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp Cell Res*. **211**:339-343.

Tsang, V.C.W., Brand, J.A., Boyer, A.E. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. **159**: 50-59.

Unnasch T.R., Galiin, M.Y., Soboslay, P.T., Erttmann K.D., and Greene B.M. 1988. Isolation and characterization of expression cDNA clones encoding antigens of *Onchocerca volvulus* infected larvae. *J Clin Invest*. **82**: 262-269.

Watanabe, D., Yamada, K., Nishina, Y., Tajima, Y., Koshimizu, U., Nagata, A., Nishimune, Y. 1994. Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J Biol Chem*. **269**: 7744-7749.

White, A.C. Jr. 1997. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis*. **24**: 101-113.

White A.C. Jr., Robinson, P., Kuhn, R. 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol*. **66**: 209-30.

White, A.C. Jr., Baig, S., Robinson, P. 1996. *Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases. *J Parasitol*. **82**: 7-10.

White, A.C., Molinari, J.L., Pillai, A.V., and Rege, A.A. 1992. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J Parasitol* **78**: 281-287.

Xiao, G., Chung, T.F., Fine, R.E., Johnson, R.J. 1999a. Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment. *J Neurosci Res*. **58**: 652-662.

Xiao, G., Chung T-F., Pyun, H.Y., Fine, R.E., Johnson, R.J. 1999. KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Mol Brain Res*. **72**: 121-128.

Yoshino, K. 1933. Studies in the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part II. On the migratory course of the oncosphaera of *Taenia solium* within the intermediate host. *J Med Ass Formosa*. **32**: 155-158.