

# Superfamilia SCP/TAPS de *Mesocestoides corti*. Contribución a la dilucidación del rol de estas proteínas durante el desarrollo estrobilar

Lic. Alicia Costáble Cristech

**Tribunal:**  
Dra. Cecilia Fernández  
Dra. Adriana Esteves  
Dra. Verónica Fernández

**Orientación:**  
Dra. Estela Castillo

Montevideo, Setiembre de 2013

agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Estela, por todo. Gracias queda extremadamente chico. Por todas sus enseñanzas, en lo que respecta a la investigación, a la docencia y a la vida en general. Gracias por su paciencia, por respetar mis tiempos y formas, por alentarme a ser independiente y a darme confianza. Por recalcar todo el tiempo la madurez que he alcanzado y por alentarme frente a resultados que *a priori* parecían adversos

A los miembros del tribunal, por aceptar corregir este trabajo luego de los tiempos especificados inicialmente

A la ANII por financiar la Beca de post-grado que me permitió dedicarme full-time a este proyecto. Por hacerme seguir un cronograma que concretó un trabajo que si no hubiera sido eterno.

A Juan Martín Marqués por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio y enseñarme los detalles de la PCR cuantitativa.

A Mónica, por permitirme ingresar a este mundo de las CRISP, que tanto amor y odio me despiertan cada día

A mis compañeros de laboratorio, Ana, Manu, Gus, Marce, Serrana, Vicky. En especial a mi amiga del alma Fer, por siempre estar dispuesta a dar una mano, largando un anticuerpo, cargando un gel, y por los momentos de desahogo y charlas de “víboras” y de las otras. Por las *in situs* compartidas para que sean más amenas. A Sole, por compartir la expresión de proteínas tipo CRISP recombinantes, por los ensayos compartidos, y los que me sumó alguna colonia mía. Mil gracias. A Uriel, que incluso a la distancia siempre tiene un consejo para dar.

A todos los compañeros de la Sección Bioquímica por todos los momentos compartidos en estos casi 6 años en el laboratorio. Por los consejos, las charlas, los mates. Gracias por hacerme sentir tan cómoda.

A mis nuevos jefes, Pepe y Leda, por permitirme el tiempo para culminar con esta etapa.

A mis amigas de carrera, Lu, Tami, Fer (doble agradecimiento), Dani. A Mini, Ame Vico y Tandis, por tantos momentos de estudio de antaño (como se extraña la época de estudiante!). En especial a Dani por compartir la locura de dejar la próspera carrera de Ingeniería, y dedicarnos a ser “más pobres” pero felices haciendo lo que nos gusta. No estaría hoy culminando esta etapa si no fuera por esas tardes de estudio veraniegas de Mecánica Newtoniana y Ecuaciones Diferenciales

A los amigos que la vida me puso en el camino y que le agradezco eternamente. Mi familia elegida, Ana, Analia, Ceci, Gaby, Manu, Mari, Moi, Nico, Vivi, gracias por estar siempre!

A mi hermanita querida, por cuidarme siempre, sobre todo en estos últimos momentos de trabajo de parto con la versión escrita de la tesis. Por darme de comer cuando me olvidaba, por cederme sus chocolates a la hora del bajón y por darme sus cigarros cuando se me terminaban. Hasta por discutir conmigo los resultados hacia el final! Gracias por esto y mucho más Lu.

A Titho, meu amor, por bancarme y apoyarme en mi carrera, por intentar comprender lo que significa hacer ciencia y bancarme la ausencia en esta última etapa.

Por último dedico este trabajo a la memoria de mi madre y mi padre, que mientras estuvieron me apoyaron siempre, acompañando mis decisiones, respetándome siempre. Gracias por todo lo que me dieron que me permite llegar a culminar esta etapa. Sé que lo que querían es que triunfe, y esto es un paso más hacia un sueño...

resumen

La superfamilia SCP/TAPS incluye miembros distribuidos a lo largo de toda la escala evolutiva que están implicados en diversas funciones. McCRISP2 es una proteína perteneciente a ésta superfamilia expresada por el cestodo *Mesocestoides corti*, cuyo transcripto fue aislado en nuestro laboratorio. Presenta varios residuos de cisteína conservados, un péptido señal de secreción y su expresión se localiza en la región anterior del organismo, donde el parásito se adhiere a su hospedero. Creemos que podría estar involucrada en la interacción hospedero - parásito, dada su posible naturaleza secretoria evidenciada por la presencia de un péptido señal de secreción y al hecho de que estudios realizados en nematodos parásitos indican que proteínas pertenecientes a ésta superfamilia son secretadas en el momento en que el organismo pasa del estadio de vida libre a la forma parasítica

Se planteó como objetivo general estudiar genes pertenecientes a la superfamilia SCP/TAPS en *M. corti*, profundizando en el gen McCRISP2. Como un aporte a la profundización del conocimiento de la superfamilia, se aislaron nuevos transcriptos con dominio SCP/TAPS aún no caracterizados para este cestodo. Se exploraron distintas estrategias para la producción de la proteína McCRISP2 en forma recombinante en distintos sistemas de expresión heteróloga. Disponer de la proteína McCRISP2 en condiciones solubles en medio acuoso nos permitirá en el futuro realizar distintos ensayos con el fin de identificar posibles macromoléculas que puedan interactuar con esta proteína. Finalmente, nos propusimos realizar una caracterización del perfil de expresión témporo – espacial de *McCRISP2* durante el desarrollo estrobilar de *M. corti*. Determinar si existe expresión diferencial y/o restringida a ciertas regiones del organismo permitirá inferir un posible rol en el ciclo de vida del parásito y generar nuevas hipótesis acerca de su posible función.

Uno de los resultados obtenidos fue el aislamiento de seis nuevos transcriptos pertenecientes a la superfamilia en *M. corti*, además de completar una de las secuencias parciales obtenidas previamente. Esto nos permitirá analizar posibles reacciones cruzadas en los ensayos de expresión durante el desarrollo estrobilar.

En cuanto a la expresión de la proteína recombinante, se utilizaron sistemas eucariotas (*P. pastoris*) y procariotas (*E. coli*). De las estrategias estudiadas, la más eficiente parece ser la producción de McCRISP2 como cuerpos de inclusión en *E. coli* y su posterior renaturalización en columna. De todas maneras, resta probar otras estrategias para optimizar estos sistemas. Es necesario también determinar si la proteína renaturalizada presenta su conformación nativa.

Con respecto al perfil de expresión a lo largo del desarrollo estrobilar, se observa una disminución en la cantidad de ARNm a medida que avanza la segmentación. Este resultado es específico para *McCRISP2*. En cuanto a la localización del ARNm y de la proteína, se observan diferentes perfiles que deben ser corroborados mediante co-localización con marcadores de los distintos tejidos del parásito (los cuales nos encontramos caracterizando). Los resultados preliminares indican una localización subtegumentaria, coherente con la hipótesis de secreción y de tener un rol en la interacción con el hospedero. Por otro lado, otros resultados indican una posible localización a nivel del sistema nervioso. Hay que destacar que en los ensayos de localización es posible estar observando reacciones cruzadas con otros miembros de la superfamilia

Estos resultados aportan al conocimiento de un miembro de la superfamilia y abren nuevos caminos para profundizar en un posible rol en particular de McCRISP2 en el ciclo de vida de *M. corti*.

índice

<b>agradecimientos</b>	<b>1</b>
<b>resumen</b>	<b>5</b>
<b>índice</b>	<b>7</b>
<b>introducción</b>	<b>12</b>
<b>1. Mesocestoides corti</b>	<b>13</b>
1.1. Clasificación	13
1.2. Características generales	13
1.3. Ciclo de Vida	14
1.3.1. Tetratiridio y multiplicación asexual en el segundo hospedero intermediario	15
1.3.2. Gusano adulto y estrobilización	17
1.3.3. Oncósferas y desarrollo post embrionario	18
1.3.4. Etapas del cultivo <i>in vitro</i> alcanzadas en el laboratorio	20
<b>2. Superfamilia SCP/TAPS</b>	<b>20</b>
2.1. Características estructurales del dominio SCP/TAPS	21
2.1.1. Motivos característicos del dominio SCP/TAPS	21
2.1.2. Estructura tridimensional del dominio e inferencias funcionales	21
2.2. Proteínas de la familia CRISP	22
2.2.1. Proteínas CRISP de mamíferos	23
2.2.2. Proteínas CRISP presentes en el veneno de reptiles	23
2.3. Proteínas de las familias Ag5 y PR-1	24
2.4. Proteínas con dominio SCP/TAPS en nematodos	24
<b>3. McCRISP2</b>	<b>25</b>
3.1. Distribución y nivel de expresión	25
3.2. Características estructurales	25
3.3. Función	27
<b>4. Objetivos</b>	<b>28</b>
4.1. Objetivos Generales	28
4.2. Objetivos Específicos	28
<b>5. Hipótesis de trabajo</b>	<b>28</b>
<b>materiales y métodos</b>	<b>29</b>
<b>1. Obtención de material biológico.</b>	<b>30</b>
1.1. Cultivo de <i>Mesocestoides corti</i>	30
1.2. Extracción de ARN	30
1.3. Extracción de proteínas	31
1.4. Preparación de material para estudios histológicos	31
1.4.1. Preparación de Criocortes	31
1.4.2. Preparación de organismos para Hibridación in toto de ARN	31
1.4.3. Preparación de organismos para Inmunohistoquímica in toto	31
<b>2. Electroforesis y blots</b>	<b>32</b>
2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	32
2.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	32
2.3. Western blot	32
<b>3. Aislamiento de genes con dominio SCP/TAPS en <i>M. corti</i></b>	<b>33</b>
3.1. 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE) de transcriptos parciales McCRISP	33
3.2. 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE) de transcriptos parciales McCRISP	35
3.3. Aislamiento de nuevos transcriptos con dominio SCP/TAPS.	37
3.4. Análisis de secuencias obtenidas	38

<b>4. Producción de la proteína McCRISP2 en forma recombinante en diferentes sistemas de expresión</b>	<b>38</b>
4.1. Estrategias para la producción soluble en <i>Escherichia coli</i>	38
4.1.1. Clonado en el vector de expresión	38
4.1.2. Expresión de la proteína recombinante	39
4.1.3. Análisis de la localización subcelular de la proteína recombinante	39
4.1.4. Plegamiento in vitro de proteínas insolubles	40
4.2. Expresión en <i>Pichia pastoris</i>	41
4.2.1. Clonado en el vector de expresión.	41
4.2.2. Transformación de levaduras	42
4.2.3. Rastreo de colonias recombinantes	42
4.2.3.1. PCR de colonia	42
4.2.3.2. Extracción de ADN genómico y PCR	42
4.2.3.3. Inmunoblot de colonia	43
4.2.4. Expresión de Proteínas Recombinantes	43
4.2.5. Verificación de la expresión de la proteína McCRISP2	44
<b>5. Análisis de la expresión de McCRISP2 a lo largo del desarrollo estrobilar de <i>M. corti</i></b>	<b>45</b>
5.1. Análisis de la expresión temporero – espacial del mensajero codificante para McCRISP2.	45
5.1.1. RT-PCR en tiempo real	45
5.1.2. Transcripción in vitro de sondas marcadas con Digoxigenina-UTP (DIG-UTP)	46
5.1.3. Hibridación in situ sobre criocortes.	47
5.1.4. Hibridación in toto sobre organismos enteros	48
5.2. Análisis temporero – espacial de la expresión de la proteína McCRISP2	48
5.2.1. Western blot sobre extractos proteicos y medio de cultivo	48
5.2.2. Inmunohistoquímica sobre criocortes	49
5.2.3. Inmunohistoquímica sobre organismos enteros.	49
<b>resultados y discusión</b>	<b>50</b>
<b>1. Genes con dominio SCP/TAPS de <i>Mesocestoides corti</i></b>	<b>51</b>
1.1. Estrategia de RACE ( <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> )	51
1.1.1. Amplificación de los extremos 3'	52
1.1.1.1. <i>McCRISP4</i>	52
1.1.1.2. <i>McCRISP1</i>	53
1.1.2. Amplificación de los extremos 5'	58
1.2. Estrategia utilizando cebadores degenerados para el motivo conservado PPA	60
1.3. Resumen de resultados y Discusión general	65
<b>2. Estrategias para la producción de la proteína McCRISP2 soluble en forma recombinante</b>	<b>70</b>
2.1. Expresión en <i>Escherichia coli</i>	70
2.1.1. Plegamiento en columna	70
2.1.2. Expresión en diversas cepas de <i>Escherichia coli</i>	72
2.1.3. Expresión como proteína de fusión a GST	75
2.2. Expresión en <i>Pichia pastoris</i>	76
2.2.1. Selección del sistema de expresión y clonado en el vector pPICZαA	76
2.2.2. Transformación en <i>P. pastoris</i>	78
2.2.3. Verificación de integración en el genoma de la levadura hospedera.	78
2.2.3.1. PCR a partir de colonias	79
2.2.3.2. PCR sobre ADN genómico	79
2.2.3.3. Análisis de clones productores de proteína por inmunoblot.	80
2.2.4. Ensayos de expresión.	81
2.3. Resumen de resultados y Discusión general	84
<b>3. Análisis de la expresión de McCRISP2 a lo largo del desarrollo estrobilar de <i>M. corti</i></b>	<b>88</b>
3.1. Análisis temporero – espacial del mensajero codificante para McCRISP2	88
3.1.1. Análisis de la expresión temporal por PCR cuantitativo	88

3.1.1.1.	Diseño experimental y justificación de la estrategia	88
3.1.1.1.1.	Obtención de organismos y réplicas	88
3.1.1.1.2.	Preparación del ADNc	88
3.1.1.1.3.	Diseño de cebadores	89
3.1.1.2.	Validación genes de referencia	90
3.1.1.3.	Validación de las técnicas de extracción de ARN y retrotranscripción	93
3.1.1.4.	Análisis del cambio en la expresión de McCRISP2	95
3.1.2.	Análisis de la expresión espacial	96
3.2.	Análisis temporo – espacial de la proteína McCRISP2	99
3.2.1.	Análisis de la expresión temporal mediante <i>Western blot</i>	99
3.2.2.	Análisis de la expresión espacial de la proteína McCRISP2	103
3.3.	Resumen de resultados y Discusión general	106
<b>conclusiones y perspectivas</b>		<b>110</b>
<b>apéndices</b>		<b>113</b>
<b>1.</b>	<b>Soluciones</b>	<b>114</b>
1.1.	Cultivo de <i>Mesocestoides corti</i>	114
1.2.	Extracción de ARN y proteínas	114
1.3.	Preparación de material para estudios histológicos	114
1.3.1.	Hibridación in toto de ARN	114
1.4.	Electroforesis	114
1.4.1.	Ácidos nucleicos	114
1.4.2.	Proteínas	114
1.5.	Western blot	115
1.6.	Plegamiento en columna	115
1.7.	Expresión de la proteína recombinante McCRISP 2 en <i>Escherichia coli</i>	115
1.8.	Expresión de la proteína recombinante McCRISP 2 en <i>Pichia pastoris</i> .	115
1.9.	Extracción de ADN genómico de levaduras	116
1.10.	Procesamiento de alícuotas de expresión	116
1.11.	Cuantificación de sondas marcadas con Digoxigenina	116
1.12.	Hibridación in situ sobre criocortes.	116
1.13.	Hibridación in toto sobre organismos enteros	116
1.14.	Inmunohistoquímica sobre cortes de parafina o criocortes	117
1.15.	Inmunohistoquímica sobre organismos enteros.	117
<b>2.</b>	<b>Cebadores diseñados</b>	<b>118</b>
<b>3.</b>	<b>Reacciones de PCR</b>	<b>119</b>
3.1.	<i>Taq DNA Polymerase (Invitrogen)</i>	119
3.2.	<i>U-Taq DNA Polymerase (SBS) y Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)</i>	119
3.3.	<i>AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen)</i>	119
3.4.	PCR de colonia ( <i>U-Taq DNA Polymerase – SBS</i> )	119
<b>4.</b>	<b>Clonado de productos de PCR.</b>	<b>121</b>
4.1.	Ligación al vector T	121
4.2.	Ligación a vectores de expresión.	121
4.3.	Transformación	121
4.4.	Verificación de la presencia de inserto	122
4.4.1.	PCR de colonia	122
4.4.2.	Minipreparaciones de ADN plasmídico	122
4.4.3.	Digestión con enzimas de restricción	123
4.4.4.	Secuenciación de ADN	123
<b>5.</b>	<b>Marcadores de peso molecular</b>	<b>126</b>
5.1.	ADN	126
5.2.	Proteínas	126

---

<b>6. Cálculos realizados a partir de los valores obtenidos por RT-qPCR</b>	<b>127</b>
6.1. Cálculo de la variación en las condiciones ensayadas de los genes elegidos	127
6.2. Cálculo de la razón de cambio de McCRISP2 en las condiciones ensayadas	128
<b><i>bibliografía</i></b>	<b>129</b>

---

introducción

## 1. *Mesocestoides corti*

Las infecciones parasitarias son un problema de salud animal y humana alrededor del mundo. En particular los cestodos, como *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*, son agentes causantes de enfermedades de relevancia sanitaria tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados (García et al., 2007). Para desarrollar estrategias de control y/o erradicación de estas enfermedades, es importante conocer los aspectos moleculares del desarrollo de éstos parásitos. También resulta de utilidad el conocimiento de los eventos claves en relación con la interacción hospedero-parásito para diseñar herramientas de diagnóstico y tratamiento. En este contexto, las proteínas secretadas por el parásito son de especial interés ya que constituyen, junto con las proteínas de superficie, la interfase entre el parásito y su hospedero (Hewitson et al., 2009).

*M. corti* es un cestodo que se ha adoptado como modelo de estudio para profundizar en el conocimiento de la biología de los cestodos debido a sus múltiples ventajas para reproducir su ciclo de vida en cultivo *in vitro* desde oncosferas obtenidas *in vivo* hasta el estadio adulto sexualmente maduro (Barret et al., 1982; Ong y Smith, 1986; Thompson et al., 1982; Vogé y Seidel, 1968). En nuestro laboratorio se han optimizado las condiciones para su cultivo desde la fase larvaria hasta el estadio adulto (Britos et al., 2000) y es utilizado desde hace un tiempo para el estudio de genes potencialmente involucrados en los eventos de su ciclo de vida que implican la invasión al hospedero y su desarrollo (Britos et al., 2007; Koziol et al., 2010; Koziol et al., 2009; Koziol et al., 2008; Lalanne et al., 2004).

### 1.1. Clasificación

Tradicionalmente se clasifica a *M. corti* dentro del Filo Platyhelminthes, dentro de la Clase Cestodos en el Orden de los Cyclophilidae (Rausch, 1994, citado por Britos, 2000). Existen diversos estudios sobre la sistemática de cestodos, aunque no hay un acuerdo sobre las relaciones de las familias dentro del orden. En estudios filogenéticos, se ha visto que la familia Mesocestoididae aparece como una rama muy basal dentro de los Cyclophilidae al considerar caracteres morfológicos, o incluso por fuera del orden cuando se analizan caracteres morfológicos y moleculares (revisado por Koziol, 2006). El desconocimiento de la totalidad de su ciclo de vida dificulta una clasificación taxonómica definitiva (Loos-Frank, 1991).

### 1.2. Características generales

Los cestodos son platelmintos endoparásitos hermafroditas. Todos los platelmintos presentan simetría bilateral, con el cuerpo aplanado dorso-ventralmente, pseudometamerización y tres capas embrionarias. A partir del mesodermo se originan capas musculares bien desarrolladas, incluyendo fibras longitudinales y circulares, y los órganos reproductivos. Los cestodos carecen de sistema digestivo, circulatorio, respiratorio y esquelético. Se alimentan mediante absorción a través de la pared del cuerpo. Presentan un sistema excretor del tipo protonefridial, con conductos excretores que culminan en un poro en la región posterior. Son acelomados y el espacio entre los órganos está compuesto por un parénquima poco compacto. El sistema nervioso consiste en una masa cerebral en la región anterior conectada con nervios longitudinales, los cuales atraviesan el cuerpo y se interconectan mediante comisuras transversales. Exteriormente están cubiertos por un tegumento que presenta microvellosidades

especializadas denominadas microtricos (Storer et al., 1986).

### 1.3. Ciclo de Vida

A pesar de que hace más de 65 años que se investiga el ciclo de vida de platelmintos del género *Mesocestoides*, aún no se ha podido determinar completamente. Se ha postulado que el ciclo de vida incluye tres hospederos, siendo dos de ellos intermediarios y el tercero definitivo (Figura 1).

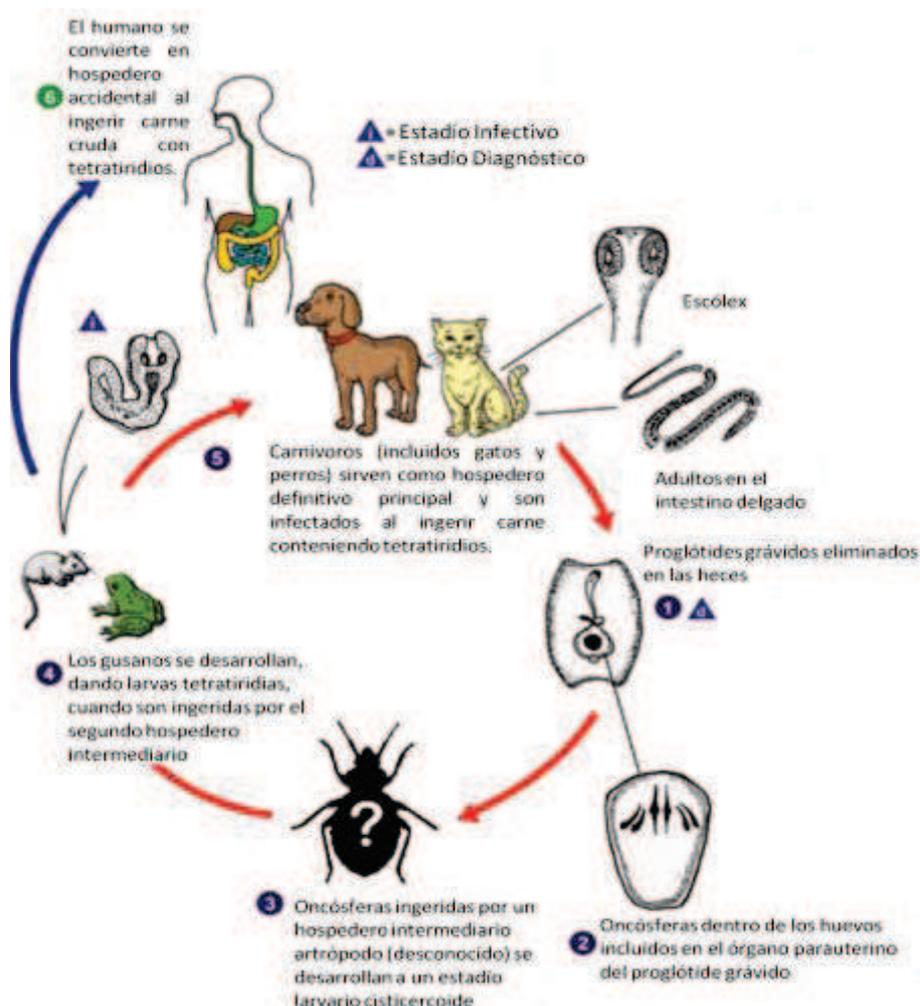


Figura 1: **Ciclo de vida de *M. corti***. Requiere tres hospederos para completar su ciclo de vida. **1:** Los proglótidos gravídeos son eliminados en las heces del hospedero definitivo (principalmente carnívoros, incluyendo cánidos, félicos y mustélidos). **2:** Dentro de cada proglótide gravídeo, cientos de oncosferas están contenidas en el órgano parauterino. **3:** El primer hospedero intermediario es presuntamente un artrópodo (de identidad desconocida), que es infectado al ingerir los proglótidos gravídeos o las oncosferas. En este se cree que las oncosferas se desarrollan a un segundo estadio larvario (cisticercoide o procercoide). **4:** Cuando el primer hospedero intermediario es ingerido por el segundo hospedero intermediario (pequeños mamíferos, aves, reptiles y anfibios) el segundo estadio larvario se desarrolla al tercer estadio larvario infectivo (tetratiridio). **5:** Los hospederos definitivos se infectan al ingerir carne contaminada con tetratiridios. En este hospedero, el cestodo se establece en el intestino delgado, donde madura. Pueden observarse proglótidos gravídeos en las heces a las dos semanas de infección. **6:** Los humanos no son los hospederos definitivos usuales, pero pueden infectarse al ingerir carne poco cocida de animales infectados con tetratiridios. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/HTML/Mesocestoidiasis.htm>.

En el ciclo de vida propuesto, los huevos producidos por el gusano adulto serían ingeridos por el primer hospedero intermediario, de identidad aún desconocida, aunque se presume podría ser un artrópodo. En éste se desarrollaría a larva cisticercoide (Webster, 1949), la cual continúa su desarrollo a larva tetratiridia cuando el primer hospedero es ingerido por el segundo hospedero intermediario. Finalmente, cuando el hospedero definitivo ingiere al segundo hospedero intermediario, el tetratiridio se desarrolla a gusano adulto, sexualmente maduro, que genera los huevos para cerrar el ciclo. Si bien se pueden reconstituir *in vitro* las etapas del ciclo de vida desde oncósferas obtenidas de infecciones naturales hasta la obtención de gusanos adultos sexualmente maduros (Thompson et al., 1982; Voge y Coulombe, 1966; Voge y Seidel, 1968), el desarrollo de larvas a partir de las oncósferas no se ha observado *in vivo*. Por esta razón no se puede comparar el desarrollo observado *in vitro* con el que ocurre en el ciclo natural del organismo.

### 1.3.1. *Tetratiridio y multiplicación asexual en el segundo hospedero intermediario*

Los tetratiridios son los estadios larvarios que infectan al segundo hospedero intermediario. Son aplanados dorso-ventralmente y en general presentan una ligera curvatura hacia el lado proliferativo, midiendo en promedio unos 2mm. Como todos los organismos del género *Mesocestoides*, carecen de rostelo, y su escólex invaginado es aplanado presentando cuatro ventosas musculares separadas de a pares por el surco apical. Su cuerpo sólido consiste en tegumento, parénquima (con numerosos corpúsculos calcáreos y células almacenadoras de glucógeno) y músculos internos. Se observa un sistema excretor compuesto por una vesícula excretoria y cuatro canales que terminan en el poro excretor en la región posterior y el sistema nervioso. No presenta ningún esbozo de aparato reproductor (Barret et al., 1982; Hess, 1980). Son capaces de infectar una gran variedad de vertebrados, tanto anfibios, reptiles, aves o mamíferos (Eckert et al., 1969).

En este hospedero son capaces de multiplicarse asexualmente en la cavidad del cuerpo y el hígado (Specht y Voge, 1965). Estos autores, estudiaron este fenómeno en ratones infectados experimentalmente y proponen dos mecanismos de multiplicación: mediante fisión longitudinal, luego de multiplicar las ventosas, o mediante brotamiento a partir de yemas generadas posteriormente al escólex. Novak (1972) realizó un estudio detallado de las distintas etapas de multiplicación, concluyendo que las yemas observadas son la consecuencia de la separación de la larva hija, más que una forma de multiplicación. En la Figura 2 se muestran las distintas etapas de la multiplicación asexual.

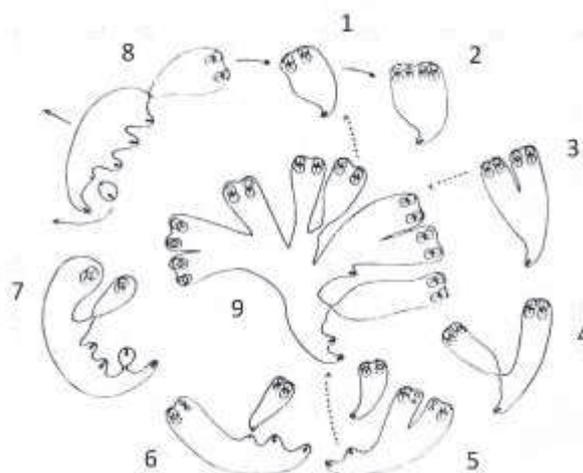


Figura 2: **Patrón de multiplicación asexual del tetratiridio de *M. corti* en roedores.** 1: Tetratiridio, 2: Profundización del surco apical y aparición de esbozos de nuevas ventosas. 3: Aumento de tamaño de las ventosas y profundización del surco longitudinal. 4: Culminación de la duplicación de las estructuras nerviosas y excretorias. Estado de división avanzado. Alejamiento de la larva hija de la parental. 5: Separación de la larva hija dejando en el punto de separación sobre el lado proliferativo de la larva parental, yemas y nuevos poros excretorios asociados a una vesícula excretoria funcional. 6: Separación de una nueva larva hija, siempre del lado proliferativo de la larva parental, en una posición anterior. 7: Por la aceleración del proceso, las nuevas larvas hijas y la parental presentan un único par de ventosas, desarrollándose el segundo luego de comenzada la división del escólex. 8: Generación de una larva alargada con numerosas yemas del lado proliferativo, que ocasionalmente pueden separarse formando un fragmento acéfalo que degenera. 9: Observación de fragmentos policefálicos que al introducirse en ratones se desintegran en tetratiridios simples. Tomado de Novak, 1972

Hess (1980) realizó un estudio ultraestructural de la larva tetratiridia y su multiplicación asexual, observando que en la región central del escólex, entre las ventosas y por debajo del surco apical, existe una masa celular reticular que contiene numerosos núcleos en mitosis (algo que no se observa en otras partes del organismo). Denominó a esta masa celular “macizo apical”. Su papel en la multiplicación asexual se muestra en la Figura 3.

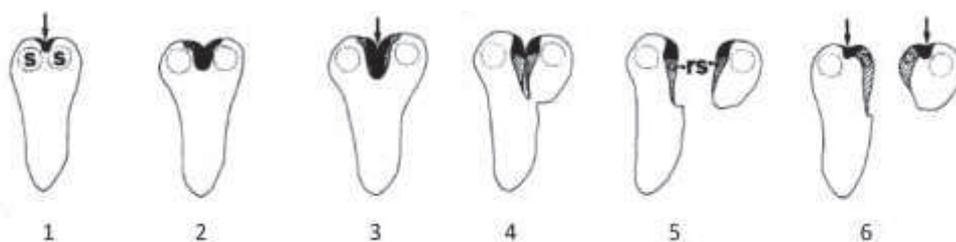


Figura 3: **Papel del macizo apical en la multiplicación asexual.** 1: Larva sin dividir. Se muestra en negro el macizo apical. 2 y 3: Comienzo de la división. El macizo apical crece, acompañando el surco longitudinal y las células laterales se diferencian en células del parénquima y del tegumento. 4: Comienzo de la separación de la larva hija. Continúa la diferenciación de las células laterales, permaneciendo las centrales sin diferenciar en la región apical. 5: Separación de la larva hija. Se muestran los esbozos del nuevo par de ventosas en cada escólex (rs). 6: Regeneración final. Se alcanza la simetría luego de la separación. Tomado de Hess, 1980

Si bien este esquema puede parecer incompatible con el presentado en la Figura 2, en cuanto a que indica que la multiplicación de las ventosas se da luego de la separación de la larva hija, cabe destacar que puede ser que las células laterales del macizo apical comiencen a diferenciarse antes de la división del escólex, originando un esbozo de las ventosas sugerido por Novak (1972). Este esquema se aplica perfectamente al estadio 7 mostrado en la Figura 2, en que por la aceleración del proceso de multiplicación se producen escólices con un solo par de ventosas.

### 1.3.2. Gusano adulto y estrobilización

El gusano adulto reside en el intestino de vertebrados carnívoros, como coyotes, zorros, zorrillos y perros (Crosbie et al., 2000; Eckert et al., 1969; Padgett y Boyce, 2004; Padgett et al., 2005). Se observa la co-existencia de tetratiridios con gusanos adultos en este hospedero. Éstos tetratiridios además son capaces de multiplicarse asexualmente (Eckert et al., 1969).

El gusano adulto es un típico cestodo segmentado, compuesto por un escólex anterior con cuatro ventosas y una estróbila formada por varios segmentos o proglótides en distintos estadios de maduración, siendo los segmentos anteriores inmaduros (en general más anchos que largos) y los posteriores maduros (en general más largos que anchos). Un esquema del gusano adulto se muestra en la Figura 4.

Los tetratiridios al ingresar al hospedero definitivo se elongan y adquieren una forma vermiforme. Suelen aparecer varios segmentos simultáneamente, siendo el desarrollo más acelerado en los posteriores. En paralelo con el desarrollo de los proglótides aparecen nuevos segmentos en la región anterior. El proceso de maduración puede determinarse cuando se analizan los segmentos sucesivos (Figura 4). Al tiempo que aparecen los segmentos, se observa el rudimento del sistema reproductor masculino (Estadio 1, Figura 4), que se diferenciará en el saco del cirro y los testículos. El sistema reproductor femenino se desarrolla levemente después que el masculino, y comienza por la aparición del rudimento femenino (Estadio 4, Figura 4). Cuando los testículos están maduros, el ovario aun está en desarrollo, aunque el útero se desarrolla simultáneamente. Para el momento que maduran los ovarios y las glándulas vitelinas, los testículos comienzan a degenerar. El segmento maduro (Estadios 5 y 6, Figura 4) incluye dos canales excretorios laterales, conectados por una comisura transversal, y los sistemas reproductores masculino y femenino. El sistema reproductor masculino está compuesto por los testículos ubicados lateralmente, conectados a vasos deferentes que desaparecen una vez que el testículo vació su contenido; y el saco del cirro, que contiene un cirro enrollado. El sistema reproductor femenino está compuesto por un ovario bilobular, con dos glándulas vitelinas pequeñas, el cual se conecta con el útero ubicado en la línea media. En el extremo posterior del útero existe una masa oscura de células que darán lugar al órgano parauterino, claramente visible en los segmentos más posteriores. Éste comienza a desarrollarse cuando los ovarios y glándulas parauterinas degeneran, una vez que el útero está lleno de óvulos y células vitelinas. Surge por la proliferación de las células de la región posterior del útero, diferenciándose en una cápsula fibrosa de paredes delgadas. En estos segmentos ya no se observan los canales excretorios. En los segmentos grávidos (Estadio 9, Figura 4) se observan en el órgano parauterino las oncósferas, que se identifican por los 6 ganchos y la cubierta fina protectora del huevo (Barret et al., 1982; Thompson et al., 1982).

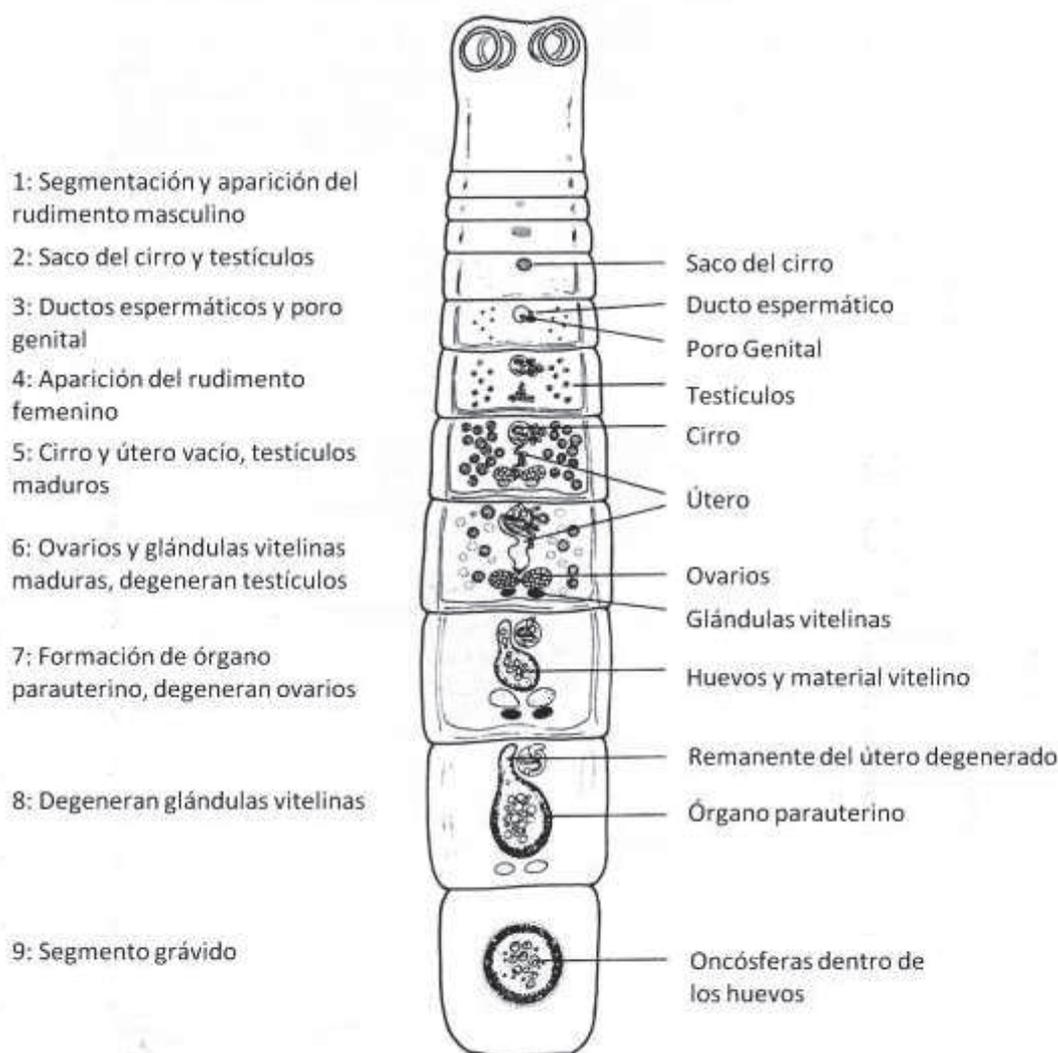


Figura 4: Esquema del gusano adulto mostrando el gradiente de maduración antero-posterior a lo largo de los proglótidos. Adaptado de Barret et al., 1982.

### 1.3.3. Oncósferas y desarrollo post embrionario

Como se mencionó anteriormente, no se conoce con certeza la identidad del primer hospedero intermediario, capaz de ser infectado por las oncósferas producidas por el gusano adulto. Soldatova (1944, citado por Loos-Frank, 1991) reportó la infección de ácaros con oncósferas, pero no obtuvo material suficiente para continuar estudiando el ciclo experimentalmente, además de que no eran animales de laboratorio con los controles adecuados que permitan descartar una infección natural previa. Webster (1949) plantea una discusión con respecto a cuál podría ser el primer hospedero intermediario, en base a la forma de alimentación del segundo hospedero intermediario, Loos-Frank (1991) retoma esta discusión. Los animales en los que se observan infecciones por tetratiridios son muy variados, incluyendo varias clases de vertebrados con diferentes hábitos. Estos autores plantean que el primer hospedero intermediario debe ser un invertebrado predador, capaz de ingerir un segmento grávido entero,

o al menos el órgano parauterino, ya que cuando se liberan las oncósferas de su cubierta se desecan rápidamente. Se descartan los anélidos o moluscos en base al tipo de alimentación de los segundos hospederos intermediarios conocidos. Dado que éstos en general son herbívoros o insectívoros, es natural pensar que el primer hospedero sería un insecto predador, o, aunque menos probable, un organismo que se alimente de materia en descomposición, pudiendo ingerir con ella las oncósferas. Siguiendo este razonamiento, se descarta cualquier tipo de vertebrado.

Webster (1949) intentó infectar 36 especies de invertebrados (insectos, nematodos, moluscos, crustáceos y anélidos) con segmentos grávidos, siendo los resultados negativos en todos los casos. Loos-Frank (1991) reportó el intento de infección de varias especies de ácaros, obteniendo los mismos resultados. Finalmente, Padgett y Boyce (2005) reportaron la presencia de ADN procedente del género *Mesocestoides* en hormigas que co-habitan con hospederos definitivos infectados. Sin embargo, estas hormigas no eran capaces de infectar al segundo hospedero intermediario.

Estas observaciones llevaron a pensar que no sería necesario un primer hospedero intermediario y que las oncósferas serían capaces de infectar lo que hoy se conoce como segundo hospedero intermediario. Varios autores (Henry, 1927 (citado por Loos-Frank, 1991); Srivastava, 1939; Webster, 1949; Witenberg, 1934) intentaron infectar anfibios, reptiles y roedores con huevos del parásito sin éxito. Otra opción, de la cual no existen reportes, es que las oncósferas eclosionen en las heces del hospedero intermediario y el embrión resultante sea el que infecte al que actualmente se conoce como segundo hospedero intermediario.

A pesar de no haber certeza de que exista un primer hospedero intermediario, y en caso de existir cuál es su identidad, se ha podido obtener tetratiridios totalmente desarrollados a partir de oncósferas mantenidas en cultivo *in vitro* (Voge y Seidel, 1968). Si bien es necesario comparar las distintas etapas del desarrollo obtenidas de esta manera con el desarrollo *in vivo*, ésta es una buena aproximación para conocer el patrón de desarrollo post-embriionario. En la Figura 5 se muestran los distintos estadios de este proceso obtenidos *in vitro*. Se partió de oncósferas eclosionadas *in vitro*, liberadas de órganos parauterinos obtenidos de infecciones naturales. En apariencia general los organismos obtenidos son similares a tetratiridios pequeños, a los cuales Voge (1967) llamó tetratiridios jóvenes. Estos difieren de los tetratiridios completamente desarrollados en la presencia del órgano apical y en el escaso desarrollo de las ventosas. Posteriormente, Voge y Seidel (1968) mejoraron las condiciones de cultivo, obteniendo tetratiridios completamente desarrollados a partir de oncósferas. Cuando transfieren los tetratiridios jóvenes a un medio sólido con sangre, aumentan progresivamente su tamaño y desarrollan sus ventosas, desapareciendo el órgano apical. Cuando estos organismos se transfieren al medio utilizado por Voge y Coulombe (1966) comienzan a multiplicarse asexualmente.

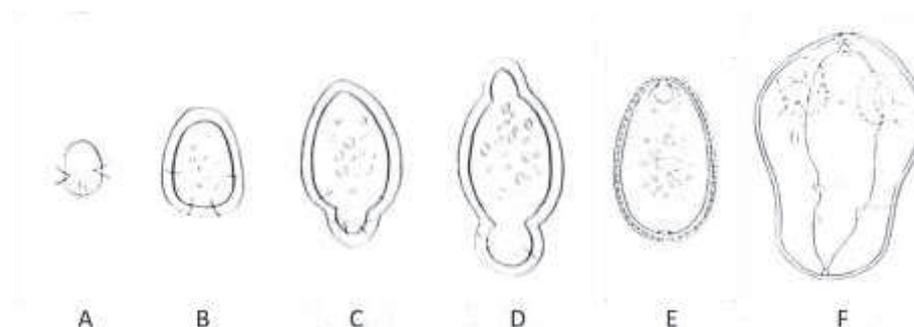


Figura 5: **Patrón del desarrollo post-embionario obtenido *in vitro***. **A:** Oncosferas al inicio del cultivo. **B:** Oncosferas crecidas con ganchos distribuidos dispersamente. **C:** Aparición de una pequeña cola en forma de bulbo conteniendo todos los ganchos, que se diferencia del cuerpo (ovoide) a los pocos días de cultivo. Todo el cuerpo se encuentra cubierto por una cubierta frágil y amorfa **D:** Diferenciación de la estructura anterior en forma bulbar. **E:** Retracción de la estructura bulbar anterior y desaparición de la cola. **F:** Aparición, a las 8 semanas de cultivo, de esbozos de ventosas y una zona en forma de copa abierta al exterior en la región anterior. Esta está llena de gránulos grandes y es denominada órgano apical. Adaptado de Voge, 1967

#### 1.3.4. Etapas del cultivo *in vitro* alcanzadas en el laboratorio

Como se mencionó anteriormente, se ha logrado reproducir la mayor parte del ciclo de vida *in vitro*, desde oncosferas obtenidas a partir de gusanos segmentados de infecciones naturales a tetratiridios (Voge y Seidel, 1968), la multiplicación asexual de éstos (Voge y Coulombe 1966), y el desarrollo estrobilar y maduración partiendo del tetratiridio hasta alcanzar el estadio adulto (Barret et al., 1982; Thompson et al., 1982). Esto, sumado a la facilidad de obtener material parasitario en grandes cantidades a partir de ratones infectados experimentalmente, constituye una de las principales ventajas para la adopción de este organismo como modelo de estudio de cestodos. Cabe destacar que los tetratiridios utilizados actualmente provienen del aislamiento inicial de Specht y Voge (1965) de tetratiridios en lagartijas (*Sceloporus occidentalis biseriatus*) infectadas naturalmente, los que fueron mantenidos por pasaje seriado en ratas y ratones de laboratorio.

## 2. Superfamilia SCP/TAPS

La superfamilia de proteínas denominada SCP/TAPS o CAP, incluye una diversidad de proteínas que contienen el dominio conservado CAP, anteriormente denominado SCP/TAPS (N° de acceso en Pfam PF00188) (Finn et al., 2008). El nombre SCP/TAPS dado inicialmente a la superfamilia deriva de las primeras proteínas estudiadas, **SCP** (*Sperm Coating Protein*), **Tpx-1** (*Testis Specific Protein-1*), **Ag 5** (*Antigen 5*); **PR-1** (*Pathogenesis-related-1*) y **Sc7/14**.

Las proteínas denominadas inicialmente SCP (Brooks et al., 1986) y Tpx-1 (Mizuki et al., 1992) pertenecen a la familia de proteínas CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Protein*) y se encuentran altamente expresadas en el tracto reproductor masculino de mamíferos. Con el descubrimiento de proteínas homólogas, tanto en mamíferos como en otros organismos, estas proteínas fueron renombradas como CRISP1 y CRISP2, respectivamente (Ver el punto 2.2). El término Ag 5 se utiliza para identificar las proteínas de la superfamilia que se encuentran como uno de los

principales alérgenos en el veneno de varias avispas (Fang et al., 1988), mientras que el término PR-1 agrupa a las proteínas expresadas en plantas en respuesta a patógenos o condiciones de estrés (Cornelissen et al., 1986). Dentro del grupo PR existen 17 clases de proteínas, siendo las del grupo PR-1 las que contienen el dominio SCP/TAPS (van Loon et al., 2006). Las proteínas Sc7 y Sc14, pertenecientes al hongo basidiomicete *Schizophyllum commune*, son expresadas durante la formación del cuerpo fructífero (Schuren et al., 1993).

Otros autores (Gibbs et al., 2008; Roberts et al., 2007, entre otros) denominan a esta superfamilia CAP, ya que plantean que este nombre sería más representativo al no hacer referencia a ninguna proteína en particular, sino a las familias más importantes (CRISP, Ag5 y PR-1) de la superfamilia. Actualmente, esta denominación está siendo cada vez más aceptada, aunque algunos autores continúan denominándola SCP/TAPS.

Los miembros de esta superfamilia se distribuyen ampliamente en la naturaleza, encontrándose en organismos tan distantes como bacterias (Yeats et al., 2003), plantas (van Loon y van Strien, 1999), cnidarios (Hwang et al., 2007) y mamíferos (Gibbs et al., 2008). En general son proteínas secretadas, aunque también existen algunas citosólicas (Chalmers et al., 2008; Kovalick y Griffin, 2005).

## 2.1. Características estructurales del dominio SCP/TAPS

### 2.1.1. Motivos característicos del dominio SCP/TAPS

El dominio SCP/TAPS o CAP consta de varios motivos conservados. Dos de ellos están definidos en Prosite (Sigrist et al., 2013) como característicos. Estos son los denominados **CRISP1** (código: PS01009: [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM] [LIVMA]Wxx[STN]) y **CRISP2** (código PS01010: [LIVMFYH][LIVMFY]xC[NQRHS]Yx[PARH]x[GL] N[LIVMFYWDN]). Además, presentan dos motivos adicionales, no descritos en Prosite que corresponden a los motivos **CAP-3** (HNxxR) y **CAP4** (G[EQ]N[ILV]) descritos por Gibbs et al. (2008).

### 2.1.2. Estructura tridimensional del dominio e inferencias funcionales

Se ha determinado la estructura de varias proteínas de la superfamilia (P14a (código PDB 1CFE), vesV5 (código PDB 1QNX), Na-ASP-2 (código PDB 1U53), Triflin (código PDB 1WVR) y GAPR-1 (código PDB 1SMB), entre otras). El dominio SCP/TAPS adopta un plegamiento del tipo sándwich  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ , en que una capa de plegamiento tipo lámina  $\beta$  se intercala entre dos capas de hélices  $\alpha$ . La estructura está estabilizada por enlaces de hidrógeno internos y por la presencia de un número variable de enlaces disulfuro. Sólo uno de estos enlaces se encuentra conservado en todos los miembros de la superfamilia analizados, mientras que los restantes se conservan dentro de cada familia. Su presencia explica la estabilidad de estas proteínas secretadas, cualidad necesaria para residir en el espacio extracelular. Un reflejo de esto es que la proteína GAPR-1 carece de enlaces disulfuro, lo que es consistente con su residencia citosólica, determinada por la ausencia de péptido señal de secreción (Gibbs et al., 2008). Un alineamiento de las proteínas con estructura conocida y el análisis de los residuos conservados en relación a su ubicación espacial, revela algunas características importantes que parecen estar conservadas. Los elementos de estructura secundaria se superponen y se observan 30 residuos conservados o con propiedades conservadas, de los cuales solo 7 están expuestos al solvente. El resto están incluidos en los motivos que definen al dominio formando interacciones en el núcleo del

mismo, estabilizando su estructura. Los residuos expuestos al solvente son importantes para establecer interacciones con otros elementos celulares para llevar a cabo su función. La estructura terciaria forma un surco expuesto al solvente, donde residen los 7 residuos conservados, y se sugiere como un sitio activo para una actividad enzimática (Figura 6). Estos residuos establecen interacciones con los residuos del núcleo del dominio, lo que remarca la incidencia de la estructura general sobre el sitio activo. Cabe destacar la presencia de cuatro residuos conservados, dos histidinas expuestas al solvente y dos residuos ácidos en el interior de la estructura, que estabilizan a las histidinas mediante enlaces de hidrógeno. Esta orientación recuerda los sitios activos de proteasas, aunque falta una histidina adicional para formar la tríada catalítica característica de las metaloproteasas (Gibbs et al., 2008). De todas maneras, esto es consistente con la actividad serin-proteasa dependiente de calcio reportada para el miembro de la familia Tex31 del molusco gastrópodo *Conus textile* (Milne et al., 2003), si bien no se observa el residuo de serina conservado en la tríada catalítica. Esto podría sugerir una nueva clase de sitio activo para proteasas o que sería necesaria una dimerización de estas proteínas para la formación del sitio activo completo.

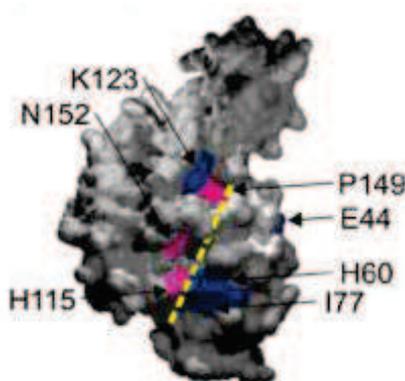


Figura 6: Residuos expuestos al solvente conservados en la superfamilia SCP/TAPS mapeados en la estructura tridimensional de Triflin. La línea punteada amarilla muestra el surco expuesto al solvente. En azul se muestran los residuos conservados con propiedades similares y en violeta los residuos estrictamente conservados. Tomado de Gibbs, 2008.

Recientemente se cristalizó un miembro de la familia expresado en insectos, que presenta un sitio de unión a lípidos y es capaz de unir leucotrienos (Xu et al., 2012). En este sentido, se ha reportado la unión a distintos tipos de lípidos por parte de miembros de esta superfamilia en distintos organismos (Choudhary y Schneiter, 2012; Serrano et al., 2004).

## 2.2. Proteínas de la familia CRISP

Estas proteínas presentan una estructura modular, con un dominio SCP/TAPS en el extremo N-terminal y una extensión C-terminal que contiene 10 residuos de cisteína conservados, a la cual se le suele denominar dominio CRD (*Cysteine-Rich Domain*). Este dominio incluye una región denominada ICR (*Ion Channel Regulator*) y una pequeña región bisagra. Las 10 cisteínas conservadas forman 5 enlaces disulfuro que son una característica distintiva de esta familia. El espaciamiento de las cisteínas en la región bisagra también es característico de cada subfamilia, siendo en este caso del tipo  $Cx_2Cx_3Cx_4C$ . Todas contienen un péptido señal de secreción lo que es consistente con su localización extracelular (Gibbs et al., 2008). La mayoría de los mamíferos

contienen tres genes parálogos para estas proteínas, ubicados en el mismo cromosoma. Como excepción se encuentran ratas y ratones que contiene cuatro genes (Nolan et al., 2006).

### 2.2.1. Proteínas CRISP de mamíferos

La primera proteína aislada perteneciente a esta familia es la actualmente denominada CRISP1. Inicialmente se denominó SCP/DE por las dos isoformas observadas de la proteína SCP (*Sperm Coating Protein*). Es una de las principales proteínas reguladas por andrógenos del fluido epididimal de ratas. Subsecuentemente se identificaron ortólogos en humanos, caballos y ratones (revisado por Gibbs et al., 2008). Se asocia con el espermatozoide y se cree que está involucrada en la inhibición de la capacitación del espermatozoide mientras atraviesa el epidídimo. También se une al oocito, evitando la fusión con el espermatozoide, por lo tanto inhibiendo la fertilización (Roberts et al., 2006). La proteína CRISP2, que se denominó inicialmente Tpx-1 (*Testis associated Protein*), es expresada en ratas, ratones, humanos y caballos. Su expresión se restringe al testículo y células germinales masculinas y está involucrada en la adhesión de las células germinales a las células de Sertoli en el epitelio seminífero (Gibbs et al., 2006). CRISP3 se encuentra más ampliamente expresada, incluyendo glándulas lacrimales, células inmunes y próstata, así como también en las glándulas salivales (Udby et al., 2002). Es interesante que este gen sea expresado tempranamente en una patología autoinmune que se caracteriza por la infiltración de leucocitos y la destrucción de las glándulas salivales y lacrimales (*Sjögren's syndrome*, reportado por Tapinos et al., 2002). La proteína CRISP4 es expresada únicamente en ratas y ratones, restringida al epidídimo. Estudios filogenéticos indican que el gen que la codifica sería el verdadero ortólogo del gen *Crisp1* humano (Nolan et al., 2006).

### 2.2.2. Proteínas CRISP presentes en el veneno de reptiles

Se han aislado varias proteínas presentes en el veneno de serpientes, las cuales presentan las características de las proteínas de la familia CRISP. Se ha demostrado que algunas de ellas inhiben la contracción del músculo liso al bloquear canales de calcio tipo L. Por otro lado, otro grupo de proteínas bloquea canales activados por nucleótidos cíclicos (canales CGN). Un análisis de las proteínas que reaccionan con el anticuerpo generado contra una de estas proteínas, muestra que están ampliamente distribuidas en los venenos de serpientes de todos los continentes (Yamazaki y Morita, 2004).

La estructura cristalográfica obtenida para otro miembro de la familia, *Stecrisp*, presente en el veneno de la serpiente *Trimeresurus stejnegeri* (código PDB 1RC9) revela que el dominio CRD en el extremo C-terminal adopta un plegamiento independiente del dominio SCP/TAPS, conectado por la región bisagra bien estructurada. El dominio CRD tiene un plegamiento compacto que es similar al adoptado por dos toxinas que bloquean canales de potasio en la anemona de mar, Bgk y Shk (Guo et al., 2005). A tal respecto, se determinó que la estructura del dominio CRD de la proteína Tpx-1 de ratón adquiere un plegamiento similar y se probó que tiene por sí mismo actividad bloqueadora de canales de calcio (Gibbs et al., 2006). Varios nematodos también expresan este dominio en una proteína independiente, la que también presenta actividad bloqueadora de canales, lo que indica que los vertebrados durante su evolución podrían haber fusionado ambos dominios en una única proteína, perteneciente a la familia CRISP (Gibbs et al., 2008).

### 2.3. Proteínas de las familias Ag5 y PR-1

Las proteínas de la familia Ag5 son uno de los principales alérgenos del veneno de varias especies de avispas (Ivanciuc et al., 2009). También se han descrito en *Drosophila*, donde forman una familia multigénica de 25 genes que pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a sus posiciones intrónicas y cantidad de cisteínas conservadas. Se observó que se expresan preferencialmente en machos adultos, por lo que se sugiere un rol en la reproducción masculina (Kovalick y Griffin, 2005). Asimismo, se han identificado en estudios de transcriptoma de glándulas salivales de insectos que se alimentan de sangre: mosquitos (Francischetti et al., 2002; Valenzuela et al., 2002b), moscas de la arena (Anderson et al., 2006; Kato et al., 2006), y garrapatas (Mans et al., 2008; Valenzuela et al., 2002a). En este caso, las proteínas Ag5 forman parte de un cóctel salival de proteínas que se cree que funcionan ya sea en la supresión del sistema inmune o en el impedimento de coagulación de la sangre para prolongar la alimentación (Gibbs et al., 2008).

La respuesta hipersensible de plantas frente a patógenos involucra una regulación en alza de las proteínas PR. Entre los 17 grupos de proteínas PR, las del grupo PR-1 son las que presentan una regulación positiva más alta y constituyen hasta el 10% del total de proteínas de las hojas infectadas (van Loon et al., 2006). Estas proteínas poseen actividad antifúngica (Niderman et al., 1995). La expresión incrementada de proteínas PR-1 en partes no infectadas de la planta sugiere un rol en la resistencia sistémica adquirida (SAR), que es análoga a la inmunidad adquirida de los mamíferos (van Loon y van Strien, 1999). La expresión de PR-1 también ocurre en distintos estadios del desarrollo de las plantas sanas. Por lo tanto, de forma similar a la situación de los mamíferos, parece haber varios roles para estas proteínas, que podrían depender del contexto de expresión (Gibbs et al., 2008) o a la existencia de diferentes funciones asociadas al dominio aun no descubiertas.

### 2.4. Proteínas con dominio SCP/TAPS en nematodos

Se han identificado proteínas de la superfamilia SCP/TAPS en varias especies de nematodos. Los gusanos parásitos pueden residir en el hospedero en función de las interacciones iniciales que establecen con el mismo, siendo de particular importancia los mecanismos de modulación de la respuesta inmune del hospedero para establecer la infección (Hawdon y Hotez, 1996). *Ancylostoma caninum* produce numerosas proteínas pertenecientes a la superfamilia que son secretadas en abundancia inmediatamente después de la transición de la larva de vida libre a la forma parasítica. Éstas incluyen a NIF (*Neutrophil Inhibitory Factor*), HPI (*Hookworm Platelet Inhibitor*), ASP1 y ASP2 (*Activation – associated Secreted Protein o Ancylostoma – Secreted Protein*). NIF es una glicoproteína de 41kDa, que bloquea la adhesión de neutrófilos activados a células endoteliales al unirse con alta afinidad al dominio extracelular de la integrina CD11b/CD18. Ésta integrina está involucrada en la transferencia de señales desde la matriz extracelular al citoplasma y en mamíferos media la inflamación mediante regulación de la adhesión de leucocitos (Moyle et al., 1994). HPI tiene un 36% de identidad con NIF e interactúa con las integrinas GPIIb/IIIa y GPIa/GPIIa presentes en la superficie de las plaquetas, inhibiendo su agregación y adhesión (Del Valle et al., 2003). ASP1 y ASP2 tienen alrededor de 30% de identidad con NIF cada una, pero su función aun no ha sido dilucidada (Hawdon et al., 1999, Hawdon et al., 1996). En el estadio adulto se identificaron 4 proteínas ASP adicionales, 3 de las cuales tienen dos dominios SCP/TAPS. Se expresan diferencialmente en distintos tejidos del parásito y se cree que pueden estar involucradas en el establecimiento o mantenimiento del

parásito en el hospedero (Zhan et al., 2003). Estas proteínas, denominadas genéricamente ASP o VAL (por su nombre en inglés *Venom Allergen Like*), son expresadas por muchos nematodos y se producen en gran abundancia inmediatamente después de la transición a la forma parasítica (Hewitson et al., 2009). Son secretadas y en base a la similitud de sus secuencias podrían tener una función relacionada con la modulación de la inmunidad del hospedero para establecer la infección. Se ha investigado el potencial de estas proteínas para el desarrollo de vacunas que permitan controlar o erradicar las infecciones desarrolladas por estos parásitos (Loukas et al., 2006). En particular, se han hecho varios estudios con una vacuna contra la proteína Na-ASP-2 de *Necator americanus*, la cual llegó a la fase dos de prueba, obteniéndose altos títulos de anticuerpos en los pacientes inmunizados (Bethony et al., 2008).

### 3. *McCRISP2*

En nuestro laboratorio, en busca de transcritos con Homeodominio en *M. corti*, sorprendentemente se aisló un transcrito parcial codificante para una proteína con homología a miembros de la familia CRISP (Britos, 2000), el cual se denominó *McCRISP1* (N° Acceso en *GenBank* AY671939). Posteriormente, intentando amplificar el extremo 3' de este transcrito, se aislaron dos transcritos adicionales similares al original, que se denominaron *McCRISP2* (N° Acceso en *GenBank* AY671940) y *McCRISP3* (N° Acceso en *GenBank* AY671941). Mediante la técnica RACE-5', se aisló el transcrito completo codificante para la proteína *McCRISP2*. Para estudiar la estructura génica, se amplificó ADN genómico (ADNg) con cebadores específicos para *McCRISP1*, obteniéndose otro gen, distinto a los anteriores denominado *McCRISP4* (N° Acceso en *GenBank* EF030551) (Britos et al., 2007).

#### 3.1. *Distribución y nivel de expresión*

Mediante RT-PCR cuantitativo, se determinó que *McCRISP2* es un gen que se expresa tanto en tetratiridios como en gusanos segmentados, con una relación *McCRISP2/GAPDH* de 0.42 para gusanos segmentados y de 0.24 para tetratiridios, indicando un aumento del 75% durante la estrobilización. En el tetratiridio la expresión está restringida al macizo apical, mientras que en los gusanos segmentados se expresa principalmente en los proglótides, asociada al desarrollo de los órganos reproductivos (Britos et al., 2007).

#### 3.2. *Características estructurales*

Mediante análisis bioinformático, se determinó que *McCRISP2* consta de 202 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 23.441 kDa y un punto isoeléctrico de 9.1. El extremo N-terminal (Figura 7) presenta residuos mayoritariamente hidrofóbicos, con un sitio de corte probable entre los aminoácidos 16 y 17 (VMA/QV) que presenta todas las características de un péptido señal de secreción (Britos et al., 2007).

En busca de motivos estructurales conservados, en la base de datos PROSITE (Sigrist et al., 2013), se determinó que contiene los motivos característicos del dominio SCP/TAPS (motivos CRISP1 y CRISP2) mostrados en la Figura 7. Se muestran además los motivos CAP-3 y CAP-4 descritos por Gibbs et al. (2008). Presenta varios sitios consenso para la introducción de modificaciones post-traduccionales que se muestran en la Figura 8 (modificado de Britos, 2000;

se considera en este caso la región codificante completa).



Figura 7: **Motivos estructurales conservados y péptido señal.** En azul se muestra el péptido señal de secreción. En rojo y violeta se muestran los motivos CAP-3 y CAP-4 y en rojo el dipéptido PY que delimita el dominio SCP/TAPS (descritos el punto 2.1.1 de esta sección). En anaranjado y verde se muestran los motivos consenso CRISP-1 y CRISP-2 descritos en el sitio Prosite.

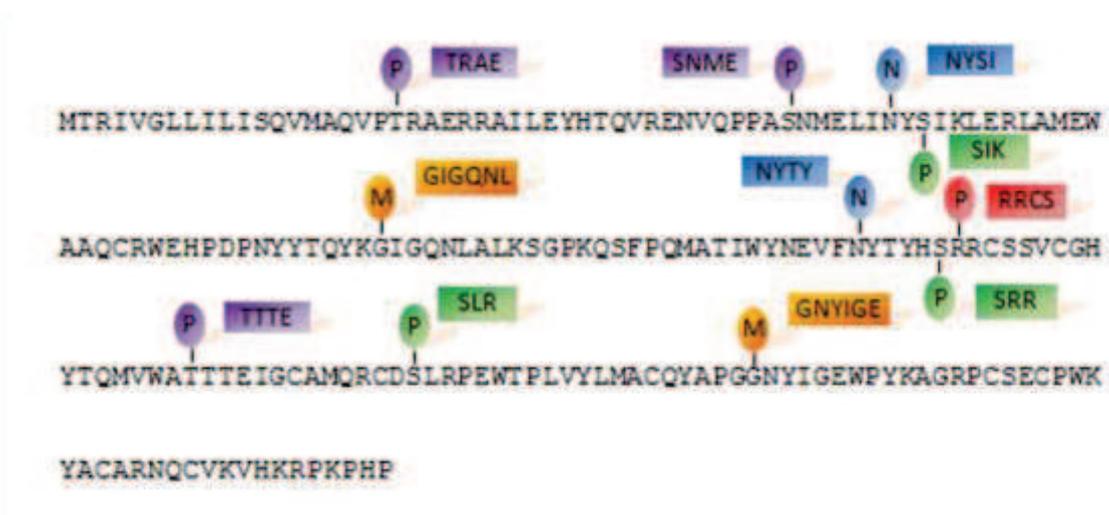


Figura 8: **Posibles modificaciones post-traduccionales de McCRISP2.** En todos los casos se muestra en un recuadro el motivo consenso para la introducción de la modificación y la modificación sobre el aminoácido correspondiente. Violeta: P: Fosforilación por la caseinquinasa II (<sup>20</sup>TRAE, <sup>43</sup>SNME, <sup>130</sup>TTTE), Azul: N: Sitio de N-glicosilación (<sup>49</sup>NYSI y <sup>108</sup>NYTY), Verde: P: Fosforilación por la quinasa PKC (<sup>51</sup>SIK, <sup>113</sup>SRR y <sup>143</sup>SLR), Rojo: P: Fosforilación por quinasa dependiente de AMPc (<sup>114</sup>RRCS), Anaranjado: M: Sitio de N-miristoilación (<sup>80</sup>GIGQNL y <sup>163</sup>GNYIGE).

Contiene 10 residuos de cisteína, conservados en la superfamilia, que forman enlaces disulfuro que estabilizan la estructura. Mediante la herramienta DISULFIND (Ceroni et al., 2006) se determinaron los presuntos enlaces disulfuro (Figura 9).

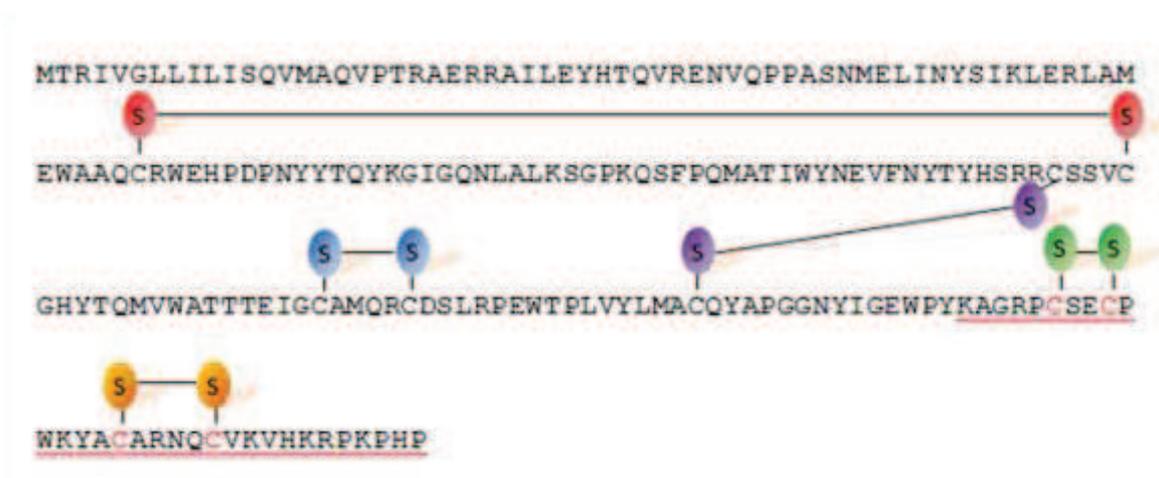


Figura 9: **Enlaces disulfuro predichos para McCRISP2.** En rojo: enlace entre  $C^{65}$  y  $C^{120}$  (confianza baja), violeta: enlace entre  $C^{116}$  y  $C^{157}$ , azul: enlace entre  $C^{136}$  y  $C^{141}$ , verde: enlace entre  $C^{177}$  y  $C^{180}$  y anaranjado: enlace entre  $C^{186}$  y  $C^{191}$  (todos con confianza moderada). Se muestra subrayada la región bisagra, con las cisteínas conservadas en rojo

Presenta una estructura modular, conteniendo en el extremo N-terminal un dominio SCP/TAPS y a continuación la región bisagra que contiene 4 de las cisteínas conservadas, con un espaciamiento  $Cx_2Cx_5Cx_4C$  (Figura 9). Este espaciamiento de las cisteínas y la ausencia de la región ICR en el dominio rico en cisteínas (CRD), que son características distintivas de las proteínas de la familia CRISP (ver punto 2), hace que la denominación McCRISP2 genere confusión. Un nombre más apropiado podría ser Mc-VAL-2 (*VAL por Venom Allergen-Like*) o Mc-PRL-2 (*PRL por Pathogenesis-Related Like*), haciéndose referencia de esta manera a su similitud con las proteínas del grupo Ag5 o PR-1, las cuales también carecen del dominio CRD.

### 3.3. Función

Aun no se ha determinado la función para esta proteína en particular, ni en general para las proteínas de la familia. Se han sugerido varias funciones para otros miembros de la superfamilia y de acuerdo a esto son posibles dos roles para McCRISP2. Dado que podría ser una proteína secretada al medio externo, al estar en la interfase entre el parásito y su hospedero, puede ser responsable de algún evento clave en la infección. Por otra parte, se ha visto que miembros de esta familia se encuentran asociados con los órganos reproductivos y su desarrollo, por lo que podría estar involucrada en algún evento de diferenciación del parásito.

#### 4. Objetivos

##### 4.1. *Objetivos Generales*

El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de la superfamilia SCP/TAPS en el cestodo *M. corti*, profundizando en el gen *McCRISP2* aislado previamente en nuestro laboratorio.

##### 4.2. *Objetivos Específicos*

- 1) Conocer la diversidad de genes conteniendo el dominio SCP/TAPS en *M. corti*. Para ello se plantea conocer los extremos 3' y 5' de los genes parciales aislados previamente, así como aislar nuevos genes pertenecientes a la superfamilia.
- 2) Explorar estrategias de expresión de la proteína McCRISP2 en forma recombinante, intentando producirla en diferentes cepas de *Escherichia coli* y en la levadura *Pichia pastoris*.
- 3) Estudiar el perfil de expresión temporal y espacial del ARNm y la proteína producidos a partir del gen *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*.

#### 5. Hipótesis de trabajo

Debido a la cantidad de genes pertenecientes la superfamilia SCP/TAPS en otros organismos, se desea verificar como primera hipótesis que *M. corti* no es una excepción y este parásito presenta genes aun no conocidos de esta superfamilia.

En segundo lugar, se desea verificar que la expresión del gen *McCRISP2* se encuentra regulada durante el desarrollo estrobilar de *M. corti*, presentando cambios en el nivel de expresión a lo largo del proceso y que la proteína McCRISP2 forma parte de los productos de excreción / secreción del parásito.

materiales y métodos

## 1. Obtención de material biológico.

### 1.1. *Cultivo de Mesocostoides corti*

Los tetratiridios de *M. corti* fueron mantenidos mediante pasajes intraperitoneales sucesivos en ratones por Jenny Saldaña y colaboradores (Facultad de Química, Universidad de la República). El aislamiento de *M. corti* utilizado fue obtenido originalmente por Specht y Vogé (1965).

Para el cultivo *in vitro* de *M. corti*, los ratones infectados fueron sacrificados mediante dislocación cervical por la Dra. Estela Castillo (habilitada por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal), y se extrajeron los tetratiridios en condiciones estériles mediante el lavado de la cavidad peritoneal con solución de *Hanks* (Apéndice 1). Los tetratiridios recogidos fueron lavados cinco veces con solución de *Hanks* estéril, y puestos en cultivo en placas con medio RPMI 1640 modificado (Apéndice 1) con 10% de suero fetal bovino (SFB; Laboratorios Santa Elena, Uruguay) en una estufa incubadora a 37°C. En ocasiones los tetratiridios fueron almacenados en solución de *Hanks* a 4°C por hasta 2 semanas antes de iniciar su cultivo. Se cultivaron aproximadamente 100 a 200µl de tetratiridios por cada 6ml de medio. Se cambiaron dos tercios del medio de cultivo cada 48 o 72 horas. Los cultivos fueron realizados con la colaboración de la Lic. María Fernanda Domínguez y la Lic. Serrana Estrade.

Para inducir el desarrollo estrobilar se añadió al medio, tras dos días de cultivo, Taurocolato de Sodio (TC; *Sigma – Aldrich*, número de catálogo T4009) a una concentración final de 1mg/ml, manteniendo la concentración de TC durante los cambios de medio. Para la obtención de la serie de organismos en distintos estadios de desarrollo se iniciaron cultivos a partir de los tetratiridios almacenados a 4°C en solución de *Hanks* con un espacio de 2 a 3 días. De esta manera se obtuvieron cultivos paralelos donde cada punto de la serie difiere en 2 o 3 días de cultivo con el anterior y el siguiente. Esto es una modificación del método reportado por Britos et al. (2000).

### 1.2. *Extracción de ARN*

Los organismos obtenidos de los cultivos *in vitro* se lavaron 3 veces en PBS (Apéndice 1) y se congelaron a -80°C en *Trizol* (*Sigma – Aldrich*). Se utilizó 1ml de *Trizol* por cada 100µl de parásitos. Se descongelaron en hielo y se disgregaron con un homogeneizador en tubos tipo *epENDORF*. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 0.2 volúmenes de cloroformo mezclando con vórtex e incubando a temperatura ambiente 5 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 12000xg a 4°C y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se precipitó el ARN con 0.5 volúmenes de isopropanol incubando 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 15 minutos a 12000xg a 4°C. Se lavó el precipitado con 1ml de etanol 70% y se secó brevemente al aire bajo lámpara. Se resuspendió en 30µl de agua mQ fresca y se incubó 10 minutos a 65°C para resuspender. Se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

Se eliminó el ADN remanente por digestión con *DNAsa RQ1* (*Promega*). Se realizó en una reacción de 100µl de volumen final conteniendo 15µl de ARN (aproximadamente 5µg), *buffer* 1X, 10 unidades de enzima y 100 unidades de inhibidor de RNAsas (*Ribolock RNase inhibitor* (*Fermentas*) o *RNase Inhibitor* (*Applied Biosystems*)). Se incubó 60 minutos a 37°C y a continuación a 65°C durante 10 minutos con *Stop Solution*. Se agregó un volumen de

cloroformo y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN durante toda la noche a  $-80^{\circ}\text{C}$  con 0.1 volúmenes de LiCl 4M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó 20 minutos a  $12000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavó con 1ml de etanol 70%. Se resuspendió en  $15\mu\text{l}$  de agua mQ fresca y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

Se verificó la integridad del ARN mediante análisis en gel de agarosa (ver punto 2.1) y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260nm.

Todo el material utilizado fue tratado con DEPC 0.1% y se utilizaron reactivos libres de RNasas.

### 1.3. Extracción de proteínas

Los organismos obtenidos de los cultivos *in vitro* se lavaron 3 veces en PBS (Apéndice 1) y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en *Buffer* de Lisis (Apéndice 1). Se utilizó 1ml de *buffer* por cada  $100\mu\text{l}$  de parásitos. Se descongelaron en hielo y se disgregaron con un homogeneizador en tubos tipo *ependorf*. Se centrifugó 30 minutos a  $15000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  para clarificar la muestra y se recuperó el sobrenadante. Los extractos proteicos se cuantificaron con el *kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific – Pierce*, número de catálogo 23225) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se verificó la calidad de las preparaciones proteicas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, ver punto 2.2)

### 1.4. Preparación de material para estudios histológicos

#### 1.4.1. Preparación de Criocortes

Se fijaron ejemplares de *M. corti* en distintos estadios del desarrollo estrobilar durante 90 minutos en Paraformaldehído (PFA) 4% diluido en PBS, a temperatura ambiente, y se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada vez con PBS. Se incubaron en sacarosa 30% diluida agua DEPC a  $4^{\circ}\text{C}$  durante al menos 48 horas y se incluyeron en medio de criopreservación (*Jung Tissue Freezing medium – Leica Microsystems*). Se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, se cortaron con criostato en láminas de  $10\mu\text{m}$  y se montaron sobre portaobjetos silanizados (*SilanePrep, Sigma-Aldrich* o *StarFrost, Deltalab*). Los cortes se dejaron secar 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### 1.4.2. Preparación de organismos para Hibridación in toto de ARN

Se fijaron ejemplares de *M. corti* en distintos estadios del desarrollo estrobilar durante 30 minutos en PFA 4% diluido en PBS, a temperatura ambiente, y se lavaron durante 5 minutos con PBSTx (Apéndice 1). Se incubaron en solución reductora (Apéndice 1) durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se lavaron durante 5 minutos en PBSTx. Se deshidrataron incubando a temperatura ambiente en metanol 50% diluido en PBSTx y metanol 100% durante 10 minutos cada uno. Se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### 1.4.3. Preparación de organismos para Inmunohistoquímica in toto

A los ejemplares con distintos días de cultivo se les quitó el tegumento como es descrito por Gustafsson (1991), incubándolos durante 5 horas en agua destilada. Posteriormente fueron fijados en PFA 4% diluido en PBS, toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , y lavados 3 veces con PBS durante 15

minutos con agitación. A continuación se deshidrataron por incubación durante 15 minutos con agitación en soluciones de concentración creciente de etanol diluido en PBS (30%, 50%, 75% y 100%). Se almacenaron los organismos a -20°C.

## 2. *Electroforesis y blots*

### 2.1. *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa*

Para el análisis de ácidos nucleicos se realizaron geles de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X (Apéndice 1). Para la siembra de las muestras se utilizó el *buffer* de carga 6X descrito en el Apéndice 1.

En el caso de geles para el análisis de ARN se utilizaron reactivos libres de RNasas y soluciones preparadas con agua tratada con DEPC.

La visualización se realizó mediante exposición a luz ultravioleta junto a la adición al gel de distintos agentes intercalantes: Bromuro de Etidio (*Sigma – Aldrich*), *GelRed*<sup>TM</sup> (*Biotium*) o *GoodView*<sup>TM</sup> (*SBS*). Los geles fueron fotografiados con una cámara fotográfica acoplada a un transiluminador de luz ultravioleta.

### 2.2. *Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.*

Para el análisis de proteínas se realizaron geles discontinuos de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE) siguiendo el método de Laemmli descrito por Gallagher (2003). Para la siembra de las muestras se utilizó el *buffer* de carga de proteínas 4X que se describe en el Apéndice 1. Se realizó la electroforesis a 15mA por gel durante la corrida en el gel concentrador y a 30mA por gel durante la corrida en el gel separador.

La tinción de proteínas se realizó por incubación en *Coomassie Blue R* (*Sigma – Aldrich*) (Apéndice 1) durante toda la noche y decolorado hasta la visualización de bandas discretas con Solución decolorante (Apéndice 1). En las condiciones en las que no se visualizaron bandas de proteínas por tinción con *Coomassie*, se realizó una tinción con nitrato de plata. Para esto se fijó el gel en solución fijadora (Apéndice 1) durante 10 minutos y se realizaron 3 repeticiones de lavados en etanol 50% durante 10 minutos y agua destilada durante 5 minutos. Se incubó brevemente en tiosulfato de sodio 0.2g/l, seguido de dos lavados breves en agua, y se incubó durante 20 minutos con la solución de nitrato de plata (Apéndice 1) protegido de la luz. A continuación se lavó con agua destilada y se incubó con solución reveladora (Apéndice 1) hasta la aparición de bandas. Se detuvo con solución fijadora durante 1 minuto y se incubó en etanol 50% durante 15 minutos. Todas las incubaciones y lavados se realizaron con soluciones frescas con agitación suave a temperatura ambiente.

### 2.3. *Western blot*

Se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm (*Thermo Scientific* - Número de catálogo 88018) equilibrada en *buffer* de transferencia (Apéndice 1) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó en un *cassette* de transferencia húmedo (BioRad Mini – PROTEAN® TetraCell) durante 2 horas a 200mA en *buffer* de transferencia y a continuación se bloqueó la membrana a 4°C durante toda la noche en

*buffer* de bloqueo (Apéndice 1). Se incubó con suero anti McCRISP2 producido en conejo o con anticuerpo monoclonal anti poli-histidina producido en ratón, según el caso (ambos diluidos en *buffer* de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 12 lavados de 5 minutos cada uno en TBST (Apéndice 1) a temperatura ambiente con agitación vigorosa. A continuación, se incubó con anticuerpo anti-IgG de ratón o conejo (según el caso) conjugado a peroxidasa de rábano, diluido en *buffer* de bloqueo, y se realizaron 12 lavados de 5 minutos cada uno en TBST a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Se visualizó la reacción mediante incubación durante 1 minuto con el reactivo quimioluminiscente *Chemiluminescent Peroxidase Substrate - 3* (CPS-3, *Sigma – Aldrich*) y se capturó la quimioluminiscencia mediante el uso de un *Gbox* (*Syngene*) o exposición a placas *Biomax MR Film* (*Kodak*) en oscuridad. Alternativamente, se reveló con el sustrato cromogénico AEC (3-Amino-9-etilcarbazol, *Sigma – Aldrich*, número de catálogo A6926) con una incubación previa de la membrana en *buffer* acetato (Apéndice 1) durante 5 minutos.

### 3. ***Aislamiento de genes con dominio SCP/TAPS en M. corti***

Se utilizó la técnica de PCR siguiendo una estrategia de 5' RACE y 3'RACE o una estrategia de amplificación utilizando cebadores degenerados.

Se describen los protocolos utilizados para las reacciones de PCR en el Apéndice 3. Todos los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa y visualizado por tinción con Bromuro de Etidio para la estrategia de RACE o *GelRed*<sup>TM</sup> para la estrategia de cebadores degenerados (Punto 2.1).

Los productos de amplificación de interés se purificaron utilizando kits comerciales (*Gel Extraction kit* (*Bioron*) para la estrategia de RACE e *Isolate PCR and Gel kit* (*Bioline*) para la estrategia de cebadores degenerados) y se clonaron en el vector *pGEM-T-Easy* (*Promega*). Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico para enviar a secuenciar (Apéndice 4)

#### 3.1. ***3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE) de transcritos parciales McCRISP***

Se sintetizó ADNc a partir de aproximadamente 2µg de ARN total de tetratiridios de *M. corti* utilizando 1000 unidades de la retrotranscriptasa *SuperScript*<sup>TM</sup> *III* (*Invitrogen*) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un cebador denominado CDS que consiste en una secuencia *oligo-dT* con un adaptador en el extremo 5' (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT AC(T)<sub>30</sub>NN –3'). La síntesis se realizó en 3 instancias utilizando distintas preparaciones de ARN extraído de tetratiridios. (ADNc#1, ADNc#2 y ADNc#3).

Se realizó una estrategia de PCR anidado para aumentar la especificidad de amplificación del 3' RACE. Por lo tanto, para cada gen *McCRISP* incompleto aislado previamente (*McCRISP 1* y *McCRISP4*) se diseñaron dos juegos de cebadores directos, para ser utilizados sucesivamente junto al cebador *SmartIII*, que es complementario a la secuencia adaptadora presente en el cebador CDS (5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'). En la Tabla 11 del Apéndice 2 se muestran los cebadores específicos utilizados en las reacciones de PCR.

Se ensayaron diversas condiciones para la amplificación de los transcritos de interés, utilizando las enzimas *Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*) o *U-Taq DNA Polymerase* (*SBS*). Los protocolos de reacción de PCR y el programa de amplificación se describen en el Apéndice 3 ( ,

encabezado 3'RACE). En la Tabla 1 se resumen las condiciones para las distintas reacciones realizadas.

Tabla 1: Reacciones de PCR (RACE 3') ensayadas para cada gen

Gen	Nombre <sup>A</sup>	Molde <sup>B</sup>	Protocolo <sup>C</sup>	Tm <sup>D</sup>
<b>McCRISP4</b>	PCR 1.i	ADNc #1 (3µl)	#2	58
	PCR2.i	PCR1.i (0.5µl)	#2	55
	PCR1.ii	ADNc #2 (3µl)	#2	58
	PCR2.ii.	PCR 1.ii (0.5µl)	#2	55
<b>McCRISP1</b>	PCR1.i	ADNc #2 (3µl)	#2	56
	PCR2.i_a	PCR1.i (0.5µl)	#2	58
	PCR2.i_b	PCR1.i (0.5µl)	#2	55
	PCR2.i_c	PCR1.i (0.5µl)	#2	Δ53-60
	PCR1.ii	ADNc #2(3µl)	#2	54.3
	PCR2.ii_a	PCR 1.ii (0.5µl)	#1	52.7
	PCR2.ii_b	PCR 1.ii (3µl)	#1	52.7
	PCR2.ii_c	PCR1.ii (0.1µl)	#1	52.7
	PCR2.ii_d	PCR1.ii (0.05µl)	#1	52.7
	PCR3.ii_a	PCR2.ii_a (0.1µl)	#1	52.7
	PCR3.ii_b	PCR2.ii_c (3µl)	#1	52.7
	PCR1.iii	ADNc #1(3µl)	#2	54.3
	PCR2.iii_a	PCR1.iii (0.5µl)	#2	52.7
	PCR2.iii_b	PCR1.iii (0.5µl)	#1	52.7
	PCR1.iv	ADNc #3 (3µl)	#1	54
	PCR2.iv_a	PCR 1.iv (0.5µl)	#1	52
PCR2.iv_b	PCR 1.iv (3µl)	#1	52	

**A:** Nomenclatura. **PCR1:** 1er PCR a partir de ADNc; **PCR2:** PCR anidado a partir del PCR1; **PCR3:** Reamplificación de PCR 2. **i-iv:** diferentes intentos de RACE, **a-d:** condiciones variadas para la PCR2.

**B:** Se indica el molde utilizado en la amplificación y el volumen de cada uno.

**C:** El número hace referencia a la Tabla 14 del Apéndice 3

**D:** Tm = Temperatura de hibridación de cebadores; Δ53-60 indica un gradiente realizado (temperaturas efectivas: 53°C, 53.7°C, 56.7°C, 58.9°C y 60°C)

En la primera reacción de PCR se utilizaron los cebadores *SmartIII* (Reverso) y el directo externo específico diseñado para cada transcrito, junto a 3µl de ADNc como molde. La segunda reacción de PCR se realizó bajo condiciones similares a la primera, excepto que como molde se utilizaron distintos volúmenes del producto de amplificación de la primera reacción, y que se utilizó el cebador directo interno específico (anidado) junto al cebador reverso *SmartIII*. Se realizaron controles negativos en los que no se incluyó el cebador directo específico para descartar posibles productos inespecíficos de amplificación (generados a partir del cebador *SmartIII* como cebador directo y reverso) y controles negativos sin molde. Asimismo, como controles positivos de la expresión en ese estadio, se realizaron reacciones utilizando cada cebador directo externo y un cebador reverso externo diseñado para el 5'RACE (ver punto 3.2)

### 3.2. 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE) de transcriptos parciales McCRISP

Se sintetizó el ADNc utilizando el *kit GeneRacer<sup>TM</sup>* con el módulo de retrotranscripción *SuperScript<sup>TM</sup> III (Invitrogen)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta manera se generó ADNc con adaptadores en ambos extremos (5' y 3') a partir de ARN total de organismos de *M. corti* en estadios larvarios (tetratiridios) o segmentados.

Se siguió también en este caso una estrategia de PCR anidado para aumentar la especificidad de amplificación. Para cada gen *McCRISP* incompleto aislado previamente (*McCRISP 1*, *McCRISP3* y *McCRISP4*) se diseñaron dos juegos de cebadores reversos, para ser utilizados sucesivamente junto los cebadores *GeneRacer - 5'* y *GeneRacer - 5' Nested*, que son complementarios al adaptador ligado en el extremo 5'. En la Tabla 12 del Apéndice 2 se muestran los cebadores específicos utilizados en las reacciones de PCR. Como un control positivo (en el caso de *McCRISP1* y *McCRISP4*), se realizaron reacciones con cada cebador reverso externo junto a un cebador directo diseñados para el 3'RACE (ver punto 3.1).

Se ensayaron diversas condiciones para la amplificación de los transcriptos de interés, utilizando las enzimas *AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen)*, *U-Taq DNA Polymerase (SBS)* o *Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)*. Los protocolos de reacción de PCR y el programa de amplificación se describen en el Apéndice 3 ( , encabezado RACE 5'). En la Tabla 2 se resumen las condiciones variables para las distintas reacciones realizadas.

En todos los casos se realizó la primera reacción de PCR utilizando 2µl de ADNc con adaptadores junto al cebador reverso externo específico diseñado para cada gen de interés y el cebador *GeneRacer - 5'* incluido en el *kit*. En la segunda reacción anidada se utilizaron distintos volúmenes de la primera reacción de PCR (Tabla 2) y un cebador reverso interno específico para cada gen junto al cebador *GeneRacer - 5' Nested*.

Tabla 2: Reacciones de PCR (RACE 5') ensayadas para cada gen

Gen	Nombre <sup>A</sup>	Molde <sup>B</sup>	Protocolo <sup>C</sup>	Tm <sup>D</sup>	
<b>McCRISP1</b>	PCR1.i	ADNc #1 (2µl)	#3	63.4	
	PCR2.i_a	PCR1.i (1µl)	#3	55	
	PCR2.i_b	PCR1.i (3µl)	#3	57	
	PCR2.i_c	PCR1.i (0.1µl)	#3	57	
	PCR3.i	PCR2.i_a (1µl)	#3	57	
	PCR2.i_d	PCR1.i (3µl)	#4	57	
	PCR2.i_e	PCR1.i (0.1µl)	#4	57	
	PCR3.i_b	PCR2.i_a (1µl)	#4	57	
	PCR1.ii	ADNc #1(2µl)	#4	55	
	PCR2.ii	PCR 1.ii (2µl)	#4	55	
	PCR1.iii	ADNc #2 (2µl)	#5	64.3	
	PCR2.iii	PCR1.iii (1µl)	#5	59.9	
	<b>McCRISP3</b>	PCR1.i	ADNc #1 (2µl)	#3	62.1
		PCR2.i_a	PCR1.i (1µl)	#3	55
PCR2.i_b		PCR1.i (3µl)	#3	57	
PCR2.i_c		PCR1.i (0.1µl)	#3	57	
PCR3.i_a		PCR2.i_a (1µl)	#3	57	
PCR2.i_d		PCR1.i (3µl)	#4	57	
PCR2.i_e		PCR1.i (0.1µl)	#4	57	
PCR3.i_b		PCR2.i (1µl)	#4	57	
PCR1.ii		ADNc #1(2µl)	#4	55	
PCR2.ii		PCR 1.ii (2µl)	#4	55	
PCR1.iii		ADNc #2 (2µl)	#5	62	
PCR2.iii_a		PCR1.iii (1µl)	#5	56.7	
PCR2.iii_b		PCR1.iii (1µl)	#5	57	
PCR2.iii_c		PCR1.iii (0.1µl)	#5	57	
PCR3.iii		PCR2.iii_b (0.1µl)	#5	57	
<b>McCRISP4</b>		PCR1.i	ADNc #1 (2µl)	#3	55.6
	PCR2.i_a	PCR1.i (1µl)	#3	55	
	PCR2.i_b	PCR1.i (3µl)	#3	57	
	PCR2.i_c	PCR1.i (0.1µl)	#3	57	
	PCR3.i_a	PCR2.i_a (1µl)	#3	57	
	PCR2.i_d	PCR1.i (3µl)	#4	57	
	PCR2.i_e	PCR1.i (0.1µl)	#4	57	
	PCR3.i_b	PCR2.i_a (1µl)	#4	57	
	PCR1.ii	ADNc #1(2µl)	#4	55	
	PCR2.ii	PCR 1.ii (2µl)	#4	55	
	PCR1.iii	ADNc #2 (2µl)	#5	54.7	
	PCR2.iii	PCR1.iii (1µl)	#5	57.7	

**A:** Nomenclatura. **PCR1:** 1er PCR a partir de ADNc; **PCR2:** PCR anidado a partir del PCR1; **PCR3:** Reamplificación de PCR 2. **i-iii:** diferentes intentos de RACE, **a-e:** condiciones variadas para la PCR2.

**B:** Se indica el molde utilizado en la amplificación y el volumen de cada uno.

**C:** El número hace referencia a la Tabla 14 del Apéndice 3

**D:** **Tm** = Temperatura de hibridación de cebadores;

### 3.3. Aislamiento de nuevos transcritos con dominio SCP/TAPS.

Se diseñaron cebadores degenerados para un motivo proteico relativamente conservado en las secuencias codificantes parciales conocidas de *M. corti* y en 9 genes codificantes para proteínas con dominio SCP/TAPS encontrados en el genoma del cestodo *E. multilocularis*. El consenso para este motivo es P(PST)(AS)(STA)(ND)M.

Se realizó un *pool* de ARN con 500ng de ARN total de organismos en distintos estadios del desarrollo estrobilar (0, 2, 4, 6, 8 y 10 días de cultivo, cada uno por triplicado). A partir de 4.5µg de este *pool* de ARN se realizó una retrotranscripción utilizando 500ng del cebador CDS (descrito en el punto 3.1) y 400 unidades de la enzima *SuperScript™ II (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de 1µl de este ADNc se realizaron reacciones de PCR independientes para cada cebador degenerado junto al cebador *SmartIII* (descrito en el punto 3.1) utilizando la enzima *U-Taq DNA Polymerase (SBS)*. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el apéndice 3 ( , encabezado PPA). Se realizó un control positivo utilizando como molde un plásmido conteniendo la región codificante de *McCRISP2*, junto a los cebadores PPASNM 1 y 2 como cebador directo y un cebador reverso específico para *McCRISP2*. Como control negativo se realizó una reacción sin molde y otra con ADNc pero sin cebador directo (para verificar que no exista amplificación inespecífica con el cebador *SmartIII* como cebador directo y reverso al mismo tiempo).

Se analizaron los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (punto 2.1) y se mezclaron los productos de amplificación como se describe en la Tabla 3 para su purificación desde la reacción.

Tabla 3: Mezclas de amplicones para clonar nuevos transcritos con dominio SCP/TAPS

Denominación de la Mezcla	Cebadores utilizados en la amplificación
PPA1	A, B, C, D Y E (motivo PPA[TS][DN]M)
PPA2	F, G, H e I (motivo PSA[AT]NM)
PPA3	J y K (motivo PTASN M)
PPA4	L, M, N y O (motivo PSSTNM)

Se transformó la cepa DH5α con la ligación de estos productos y el vector *pGEM-T-Easy (Promega)*, como se describe en el Apéndice 4. Las colonias obtenidas se ordenaron en una nueva placa de LB-Ampicilina numerada. Para la verificación de la incorporación del inserto y el tamaño del mismo se realizó una PCR de colonia. Para ello, se resuspendió una colonia aislada en 10µl de agua estéril y se utilizó 1µl como molde para realizar las reacciones de PCR, junto a los cebadores T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-TAGGTGACACTATAGAATA-3') complementarios a los promotores flanqueantes al sitio de policlonado del vector. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el apéndice 3 ( , encabezado "Colonia 1"). Se realizó un control positivo, consistente en una colonia conteniendo el plásmido *pGEM-T Easy* con la región codificante para la proteína *McCRISP2* verificada por secuenciación. Como control negativo se utilizó una colonia azul de la transformación (vector sin inserto).

Se analizaron los productos de PCR en geles de agarosa (Punto 2.1) y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias seleccionadas para enviar a secuenciar

(Apéndice 4)

### 3.4. Análisis de secuencias obtenidas

Para determinar la identidad de las secuencias obtenidas se realizó en primer lugar una búsqueda en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la herramienta BLAST (Johnson et al., 2008), mientras que para buscar secuencias homólogas a las obtenidas en los platelmintos de interés se realizó una búsqueda mediante BLAST en la base de datos GeneDB (Logan-Klumpler et al., 2012). Para la búsqueda de motivos conservados se utilizó la herramienta *Conserved Domain Search (CDSearch)* (Marchler-Bauer et al., 2011).

Los alineamientos se realizaron con el programa *ClustalX* (Thompson et al., 1997) y se visualizaron mediante el programa *BioEdit* (Hall, 1999). Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011)

## 4. Producción de la proteína McCRISP2 en forma recombinante en diferentes sistemas de expresión

En trabajos anteriores, se clonó la región codificante de McCRISP2 en el vector de expresión *pET22b (Novagen)* fusionado al péptido de exportación periplásmica *pelB* en el extremo N-terminal y a una cola de histidinas en el extremo C-terminal (Costábile, 2009). A partir de este plásmido (*pET22b-McCRISP2*) se subclonó la región de interés en los vectores elegidos para la expresión en cada sistema.

### 4.1. Estrategias para la producción soluble en *Escherichia coli*

#### 4.1.1. Clonado en el vector de expresión

Se diseñaron cebadores (Tabla 13, Apéndice 2) para clonar la región codificante de la proteína McCRISP2 madura completa (excluido el péptido señal de secreción predicho). Estos cebadores se fusionaron a los sitios de restricción para las enzimas *SpeI* (Cebador directo) y *XhoI* (Cebador reverso) para el clonado direccional en el vector *pET41a (Novagen)* que permite expresar las proteínas recombinantes como fusión a GST. En el cebador directo se incluyó a continuación del sitio de restricción, la secuencia correspondiente al sitio de clivado de trombina para la eliminación de GST. De esta manera se obtuvo la secuencia codificante en marco con GST en el extremo N-terminal y una cola de histidinas en el extremo C-terminal.

Se realizó una reacción de PCR con la enzima *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* a partir de 0.5µl del plásmido *pET22b-McCRISP2* utilizando estos cebadores. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el apéndice 3 ( , encabezado "*pET41a*").

Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (punto 2.1) con tinción con *GelRed™*. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *ISOLATE PCR and Gel (Bioline)* y se clonaron en el vector *pGEM-T-Easy (Promega)* como se describe en el Apéndice 4, transformándose la cepa DH5α.

El vector de expresión *pET41a* y los plásmidos verificados por secuenciación se digirieron en

primer lugar con 10 unidades de la enzima *BcuI* (Isoesquizómero de *SpeI* – *Fermentas* – *Thermo Scientific*) en *buffer* Tango 1X (*Fermentas* – *Thermo Scientific*) en una reacción de 50µl de volumen final conteniendo 10µl de plásmido. Se incubó esta reacción durante 2 horas a 37°C y se analizó una alícuota en gel de agarosa para verificar la linealización total del plásmido. A continuación se agregaron 10 unidades de la enzima *XhoI* (*Fermentas*) y *buffer* Tango 10X (*Fermentas* – *Thermo Scientific*) de modo de obtener una concentración final 2X, óptimo para esta enzima. Se incubó la reacción durante 2 horas a 37°C y se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa. Se purificaron los productos de digestión desde el gel con el *kit ISOLATE PCR and Gel* (*Bioline*) y se ligaron los insertos y el vector *pET41a* utilizando 10 unidades de la enzima *T4 DNA Ligase* (*Fermentas*). Se siguió con la transformación en la cepa DH5α y el aislamiento de plásmidos para la verificación de la construcción por secuenciación como se describe en el Apéndice 4.

#### 4.1.2. Expresión de la proteína recombinante

Una vez verificada la secuencia de la construcción se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* (Apéndice 4). Se utilizaron las cepas BL21 *Star* (*Invitrogen*), BL21 *CodonPlus* RIL (*Stratagene*), BL21 *pLysS* (*Promega*) o *SHuffle T7* (*New England Biolabs*) para la expresión de McCRISP2 en el vector *pET22b*, mientras que para el vector *pET41a* únicamente se ensayó la expresión en la cepa *SHuffle T7* (*New England Biolabs*). Los genotipos de estas cepas se muestran en el Apéndice 4 (Tabla 16).

La expresión de proteínas se realizó en medio LB (Apéndice 1) suplementado con los antibióticos indicados en la Tabla 15 del Apéndice 4 dependiendo del plásmido y la cepa utilizada (medio selectivo).

Se partió de un precultivo con una colonia aislada en 3ml de medio selectivo crecido durante toda la noche a 37°C. Se inocularon matraces conteniendo 250ml de medio con 2.5ml de precultivo y se incubaron a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar un DO<sub>600</sub> de 0.6. En ese momento se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 1mM. Se dejó inducir a 37°C durante distintos tiempos.

Se tomaron alícuotas de 1ml de cultivo para la verificación de la expresión. Se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad y se recuperó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en 0.1 volúmenes de 100mM Tris – HCl pH8 y se combinó con el mismo volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X (Apéndice 1). Esta muestra constituyó la denominada Fracción Total (FT). El medio de cultivo se volvió a centrifugar 20 minutos a máxima velocidad para eliminar cualquier célula remanente. Se mezcló un volumen de medio de cultivo con un volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X, constituyendo la denominada Fracción Medio (FM). Una vez combinadas con *buffer* de carga de proteínas, las muestras se calentaron a 90°C durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C o se procedió inmediatamente a su análisis por SDS-PAGE.

El resto del cultivo fue centrifugado a 10000xg por 10 minutos, descartando el medio de cultivo y congelando el sedimento celular para análisis posteriores.

#### 4.1.3. Análisis de la localización subcelular de la proteína recombinante

Para la determinación de la solubilidad de la proteína recombinante, se realizó un

fraccionamiento subcelular. En todos los casos se tomó una alícuota de 1ml de cultivo para obtener la fracción total (FT) y la fracción medio (FM) como se describió en el punto 4.1.2.

Se realizó además una precipitación de las proteínas de la fracción medio clarificada mediante el agregado de 10% de TCA, almacenándose la mezcla durante toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó 30 minutos a 14000xg a 4°C y se lavó el precipitado 2 veces con acetona. Se resuspendió el precipitado en 0.1 volúmenes de 30mM Tris – HCl pH 8 y se mezcló con el mismo volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X.

En el caso de la expresión en el vector *pET22b(+)* se comenzó extrayendo las proteínas del periplasma. Para ello, el sedimento celular del cultivo se resuspendió en 0.1 volúmenes de *buffer* de extracción periplásmica (Apéndice 1). Se incubó a 4°C durante 30 minutos y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 10000xg. El sobrenadante constituyó la denominada Fracción Periplásmica (FP). Se tomó un volumen de FP y se precipitó por adición de TCA, como se describió para la FM. Alternativamente, se siguió el protocolo descrito para el sistema de expresión *pET* (Novagen, 2006).

En el caso de la expresión con ambos vectores se analizó la presencia de la proteína recombinante en la fracción soluble o en la fracción insoluble. Para ello, el sedimento celular (obtenido al finalizar el cultivo en el punto anterior o luego de extraer el periplasma) se resuspendió en *buffer* de lisis (Apéndice 1) y se congeló a -20°C. Al descongelarse se lisaron las células por sonicado al 60% de la amplitud mediante la aplicación de 3 pulsos de 30 segundos interrumpidos por 1 minuto en hielo. Se centrifugó a 10000xg durante 45 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que constituyó la denominada Fracción Soluble (FS). Se tomó un volumen de FS y se mezcló con un volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X. El sedimento remanente (denominado “cuerpos de inclusión”) se lavó 2 veces con 50mM Tris – HCl pH 7.5 y se resuspendió en un *buffer* de resuspensión desnaturalizante (Apéndice 1), constituyendo la denominada fracción insoluble (FI). Se mezcló un volumen de FI con un volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X.

Todas las muestras una vez mezcladas con *buffer* de carga de proteínas fueron calentadas a 90°C durante 5 minutos y almacenadas a -20°C o analizadas en el momento por SDS – PAGE y tinción con *Coomassie Blue* (Punto 2.2)

#### 4.1.4. Plegamiento *in vitro* de proteínas insolubles

Para el plegamiento *in vitro* a partir de los cuerpos de inclusión se siguió el protocolo de purificación descrito por Pellizza (2010). Para ello, se partió de los sedimentos celulares obtenidos como se describe en el punto 4.1.2 a partir de la expresión de *E. coli* BL21 *Star* transformada con el plásmido *pET22b-McCRISP2*. Los mismos se resuspendieron en un *buffer* de lisis con lisozima (Apéndice 1) y se incubó la suspensión a temperatura ambiente por 2 horas. Se centrifugó a 20000xg por 15 minutos y se resuspendieron las células en un *buffer* conteniendo el detergente no iónico Igepal CA 630 (*Sigma – Aldrich*) (Apéndice 1). Se lisaron las células por ultrasonido en un protocolo de 10 pulsos de 1 minuto a máxima potencia (25 watts) y los cuerpos de inclusión fueron colectados por centrifugación a 20000xg por 30 minutos. Se realizaron dos lavados con agua, aplicando posteriormente 3 pulsos de ultrasonido al 50% de la potencia máxima. Se realizó una última centrifugación a 20000xg por 30 minutos y los cuerpos de inclusión aislados fueron solubilizados en un *buffer* conteniendo urea (Apéndice 1). La solución fue incubada a 16°C toda la noche.

La renaturalización de la proteína se realizó mediante unión de la misma a una resina conteniendo níquel seguida de un gradiente de concentración de urea. Para ello, la solución obtenida luego de disolver los cuerpos de inclusión fue cargada en la columna previamente equilibrada en *buffer* de *binding* (Apéndice 1). La renaturalización se realizó mediante un gradiente lineal de urea (6M a 1M) generado por un equipo de FPLC (*Pharmacia*) en 1 hora 30 minutos a un flujo de 0.3ml/min con la proteína unida a la matriz de Ni-NTA agarosa, según lo recomendado por el fabricante de la matriz (*QIAGEN*) y descrito originalmente por Holzinger et al. (1996). Las soluciones utilizadas para la creación del gradiente se describen en el Apéndice 1 (Solución A y Solución B). Para la elución se utilizaron distintos *buffers*, cuya composición se describe en el Apéndice 1. Se utilizó 1 ml de matriz Ni-NTA Agarosa cada 250 ml de cultivo tratado en las condiciones descriptas anteriormente.

## 4.2. Expresión en *Pichia pastoris*

### 4.2.1. Clonado en el vector de expresión.

Se diseñaron cebadores (Tabla 13, Apéndice 2) para amplificar la región codificante de McCRISP2, fusionados a los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI* (cebador directo) y *Sall* (cebador reverso) para el clonado direccional en el vector *pPICZ $\alpha$ A* (*Invitrogen*). De esta manera se obtuvo la región codificante en marco con el péptido señal de secreción codificado en el vector en el extremo N-terminal ( $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae*) y una cola de histidinas en el extremo C-terminal.

Se realizó una reacción de PCR con la enzima *U-Taq DNA polimerasa* (*SBS*) a partir de 0.5 $\mu$ l de un plásmido conteniendo la región codificante completa verificada por secuenciación utilizando estos cebadores. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se muestran en el Apéndice 3 ( , encabezado pPICZ). Se analizó el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio (Punto 2.1). Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *QIAQuick Gel Extraction* (*QIAGEN*) y se clonaron en el vector *pJET1.1* (*Fermentas*) como se describe en el Apéndice 4.

Los plásmidos conteniendo el inserto verificados por secuenciación se digirieron con 5 unidades de cada una de las enzimas *EcoRI* y *Sall* (*Fermentas*) en *buffer Orange 1X* (*Fermentas*) en una reacción de 20 $\mu$ l de volumen final conteniendo 4 $\mu$ l de plásmido. Se incubó esta reacción durante 2 horas a 37°C y se analizó una alícuota en gel de agarosa al 1% para verificar la digestión total de los plásmidos. Se purificaron los productos de digestión desde el gel con el kit *QIAQuick Gel Extraction* (*QIAGEN*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otra parte, se digirió el vector de expresión *pPICZ $\alpha$ A* en condiciones similares a la anterior, salvo que la reacción se realizó en 50 $\mu$ l de volumen final con 10 unidades de cada enzima y 20 $\mu$ l de plásmido. Los productos de digestión se purificaron desde el gel con el kit *ISOLATE PCR and Gel* (*Bioline*) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se ligó el inserto al vector *pPICZ $\alpha$ A* purificados utilizando 5 unidades de la enzima *T4 DNA Ligase* (*Fermentas*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se siguió con la transformación de células de la cepa XL1 de *E. coli* y el aislamiento de plásmidos para la verificación de la construcción por secuenciación como se describe en el Apéndice 4.

Una vez secuenciada la construcción, verificando que la región codificante de McCRISP2 se encuentra en marco con el péptido de secreción y la cola de histidinas., se procedió a linealizar

el plásmido con la enzima de restricción *SacI* (*Fermentas*). Para ello se realizó una reacción de 100µl de volumen final conteniendo *buffer SacI* 1X suministrado con la enzima, 50 unidades de enzima y 25µl de plásmido. Se incubó la reacción a 37°C durante 4 horas y se precipitó durante toda la noche a -20°C con 0.1 volúmenes de Acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó durante 30 minutos a 15000xg a 4°C, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 15µl de agua mQ. Se analizó en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Se cuantificó por espectrofotometría a 260nm. Ocasionalmente, previo a la precipitación se realizó una extracción con Fenol : Cloroformo (1:1, v/v) para aumentar el grado de pureza.

#### 4.2.2. Transformación de levaduras

Se utilizaron las cepas de *P. pastoris* GS115 (cepa auxotrófica para histidina, *his4*), X33 (cepa salvaje) y KM71H (cepa que expresa únicamente el gen AOX2, *arg4 aox1::ARG4*) incluidas en el kit *EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen)*. Para la transformación se ensayaron dos métodos. En primer lugar, se transformaron las cepas X33 y KM71H con 10µg de plásmido linealizado, utilizando el kit *EasyComp™ (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El siguiente método de transformación elegido fue el de electroporación sugerido en el manual del *EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones allí indicadas. En este caso se transformó la cepa GS115 (*Invitrogen*) utilizando el programa pre-seteado para *P. pastoris* en el equipo *Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (BioRAD)*.

En ambos casos se plaquearon las transformaciones en placas de YPDS – Agar (Apéndice 1) conteniendo 100µg/ml de Zeocina (*Invitrogen*) y se incubaron a 30°C durante 3 días. Las colonias que crecieron se aislaron por estriado en nuevas placas y se ordenaron en una nueva placa de YPD sin selección.

#### 4.2.3. Rastreo de colonias recombinantes

##### 4.2.3.1. PCR de colonia

En primer lugar se analizaron las colonias obtenidas mediante PCR de colonia siguiendo el protocolo indicado en el *EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen)*. Se utilizaron los cebadores 3'-AOX1 y 5'-AOX1 flanqueantes al sitio de clonado en el vector. La reacción se realizó utilizando la enzima *U-Taq DNA Polymerase (SBS)*, siguiendo las condiciones de reacción y el programa de amplificación descrito en el Apéndice 3 ( , encabezado colonia 2). Como molde se utilizaron 5µl de una suspensión de cada colonia en agua estéril calentada 5 minutos a 95°C. Se analizaron también muestras preparadas por incubación con lincasa (*Sigma Aldrich*) como sugiere el manual *EasySelect™ Pichia Expression*. Se incluyó en cada serie de reacciones un control positivo conteniendo 0.5µl del plásmido utilizado para la transformación. Como control negativo se realizaron reacciones sin ADN. Se analizaron 10µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con *GelRed™* (Punto 2.1).

##### 4.2.3.2. Extracción de ADN genómico y PCR

Para la extracción de ADN genómico se cultivó una colonia aislada en 5ml de medio YPD a 30°C durante toda la noche. Se centrifugaron 4.5ml del cultivo a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se removió el medio y se resuspendieron las células en 150µl de

*buffer* STES (Apéndice 1). Se agregó un volumen de *acid washed glass beads* (Sigma – Aldrich) y se vortexó 30 segundos. Se agregó 60µl de *buffer* TE (Apéndice 1) y 30µg de RNasa. Se incubó a 37°C durante 15 minutos y se agregó 1 volumen de Fenol: Cloroformo (1:1, v/v). Se vortexó un minuto y se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a -20°C por 20 minutos o durante toda la noche. Se centrifugó a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C y se lavó el precipitado con 100µl de Etanol 70%. Se centrifugó a máxima velocidad a temperatura ambiente 5 minutos y se dejó secar bajo lámpara. Se resuspendió el ADN en 40µl de *buffer* TE y se analizó una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE 1X teñido con *GelRed*<sup>TM</sup>.

El PCR se realizó con la enzima *U-Taq DNA Polymerase* (SBS) y los cebadores 3'-AOX1 y 5'AOX descritos anteriormente. Se utilizaron las condiciones de reacción y el programa de amplificación descrito en el Apéndice 3 ( , encabezado PCR ADNg) con 5µl de ADN genómico como molde. Como control positivo se incluyó un control positivo conteniendo 0.5µl del plásmido utilizado para la transformación y como control negativo se realizaron reacciones sin ADN. Se analizaron 15µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con *GelRed*<sup>TM</sup>.

#### 4.2.3.3. Inmunoblot de colonia

Se realizó una transferencia de las colonias presuntamente transformantes a una membrana de nitrocelulosa según lo descrito por Wung y Gascoigne (1996). Para ello se repicaron las colonias obtenidas de la transformación en una placa de medio MDH (medio no inductivo) y en una placa de MMH (medio inductivo). Se incubaron a 30°C durante 3 días con agregado de metanol 100% a la tapa de la placa cada 24 horas para compensar la evaporación del inductor. Una vez crecidas las colonias, se colocó la membrana sobre la placa de MMH y 3 hojas de papel Whatman. Se colocaron toallas de papel absorbente y un peso encima. Se transfirió durante 3 horas a temperatura ambiente y se lavó la membrana con TBST (Apéndice 1). Se continuó con el bloqueo y el revelado como se describió para el *Western blot* (Punto 2.3), utilizando un anticuerpo monoclonal anti poli-histidina producido en ratón (Sigma – Aldrich, N° catálogo: H1029) diluido 1/2500. Para el revelado, se incubó con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (*GE Healthcare*, N° catálogo: NA9310, o *DAKO*, N° catálogo: P0447) diluido 1/2000. Se visualizó mediante quimioluminiscencia capturada en placas fotográficas (punto 2.3)

#### 4.2.4. *Expresión de Proteínas Recombinantes*

Se partió de una colonia aislada verificada por alguno de los métodos descritos en el punto 4.2.3, la cual se inoculó en 5ml de medio YPD (Apéndice 1) en tubos tipo *falcon* de 15ml. Se incubó el cultivo toda la noche a 28°C con agitación y se midió la DO<sub>600</sub> del cultivo. Se utilizó para inocular matraces conteniendo diferentes volúmenes de medio BMGY (Apéndice 1) indicados en la Tabla 4. Se inoculó con el volumen necesario para obtener una DO<sub>600</sub> inicial de aproximadamente 0.01. Se incubó toda la noche a 28°C con agitación hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 4 a 10. Se centrifugó el cultivo a 3000xg durante 5 minutos y se resuspendió el sedimento celular en diferentes volúmenes de medio conteniendo metanol (Tabla 4) y se incubaron por 3 o 6 días a 28°C con agitación. Todos los días de inducción se adicionó metanol para compensar el consumo y evaporación y se tomaron alícuotas de 1ml de cultivo para monitorear la producción

a lo largo de los días.

Tabla 4: Condiciones de expresión en *Pichia pastoris*

N°	Clones Ensayados	Cultivo s/metanol <sup>A</sup>		Cultivo c/metanol <sup>B</sup>		% MeOH <sup>D</sup>	RPM <sup>E</sup>	Días <sup>F</sup>
		Medio	Vol. <sup>C</sup>	Medio	Vol. <sup>C</sup>			
1	T38, HSA y LacZ	BMGY	100	BMMY	25	0.5	200	6
2	T32, HSA y LacZ	BMGY	25	BMMY	250, 120 y 175	0.5	200	3
3	T31 y HSA	BMGY	25	BMMY	100	2	200	6
4 <sup>1</sup>	P22 y P29	BMGY	25	BMMY	100	2	200	6
4 <sup>2</sup>	P22 y P29	BMGY	25	BMMY	100	2	200 <sup>+</sup>	6
5	R6, T16, R18, R25, T41, T43 y HSA	BMGY	10	MMH	20	2	250	3
6	6, 25, 32, 43 y HSA	BMGY	10	BMMY	10	1	250	3

**A:** Condiciones de crecimiento sin inducción. **B:** Condiciones de inducción. **C:** Volumen de cultivo (en ml). **D:** Porcentaje de Metanol utilizado como inductor. **E:** revoluciones por minuto (el superíndice + indica que se utilizaron matraces acanalados). **F:** Días durante los que se mantuvo la inducción.

El procesamiento de las alícuotas se realizó según lo sugerido en el manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* para el análisis de la expresión por SDS-PAGE. Brevemente, se centrifugaron las alícuotas a máxima velocidad durante 2 minutos y recuperaron los sobrenadantes. Estos se centrifugaron durante 20 minutos a máxima velocidad para clarificarlos y se mezcló una parte de cada alícuota de medio con una parte de *buffer* de carga de proteínas 4X. El sedimento de células se resuspendió en 0.1 volúmenes del *Breaking buffer* (Apéndice 1) y se vortexó tras el agregado de un volumen de *acid washed glass beads*, como sugiere el manual. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Este constituyó la fracción soluble y se combinó con un volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X. El sedimento se resuspendió en 0.1 volúmenes del volumen inicial de 30mM Tris – HCl pH 7.5 y se combinó con un volumen de *buffer* de carga de proteínas 4X. Esta fracción constituyó la fracción insoluble. Eventualmente se trató con liticase para aumentar la lisis celular. Para ello, se resuspendió el sedimento en 0.1 volúmenes de agua y se trató a 30°C durante 20 minutos con 125 unidades de liticase (*Sigma – Aldrich*). Se centrifugó a 1500xg durante 5 minutos y se colectó el sobrenadante de acuerdo a lo descrito recientemente.

#### 4.2.5. Verificación de la expresión de la proteína McCRISP2

Se analizó la presencia de proteína recombinante en el medio de cultivo, en la fracción soluble o en la fracción insoluble mediante SDS – PAGE y tinción con *Coomassie Blue* o Nitrato de plata

(Punto 2.2). Se realizó además *Western blot* o *dot blot* siguiendo lo descrito en el punto 2.3, utilizando un anticuerpo monoclonal anti poli-histidina (*Sigma – Aldrich*, N° catálogo: H1029) producido en ratón diluido 1/2500, seguido de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (*DAKO*, N° catálogo: P0447 o *GE Healthcare*, N° catálogo NA9310) diluido 1/2000. La visualización se realizó mediante quimioluminiscencia.

## 5. Análisis de la expresión de *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*

### 5.1. *Análisis de la expresión temporo – espacial del mensajero codificante para *McCRISP2*.*

#### 5.1.1. *RT-PCR en tiempo real*

El diseño experimental y las reacciones de PCR cuantitativo se realizaron bajo la orientación del Dr. Juan Martín Marqués en el Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina).

Para obtener los organismos en distintos estadios del desarrollo se largaron cultivos en paralelo iniciados con dos días de diferencia como se describe en el punto 1.1. Se realizó de esta manera para procesar todos los organismos en paralelo y minimizar la variabilidad que surgiría simplemente por procesarlos en distintos momentos. El cultivo se realizó por triplicado a partir de organismos obtenidos del mismo ratón (réplicas técnicas del cultivo).

Los organismos cultivados de esta manera fueron analizados bajo lupa y separados manualmente para obtener una población con un nivel de desarrollo homogéneo en cada punto. Es necesaria esta etapa ya que los cultivos de *M. corti* no son sincrónicos, obteniéndose en el mismo punto de la curva de desarrollo organismos en diferentes estadios.

Se extrajo el ARN como se describió en el punto 1.2, realizando el tratamiento con DNasa de la mitad del volumen obtenido. Se retrotranscribió el ARN con la enzima *SuperScript™ III* (*Invitrogen*) utilizando 500ng de ARN total, 250ng de cebadores al azar (*Invitrogen*), 0.5mM de cada dNTP, 40 unidades de inhibidor de RNasas (*Ribolock RNase Inhibitor – Fermentas*), y 200 unidades de enzima en un volumen final de 20µl. Se incubó la reacción durante 60 minutos a 50°C y a continuación 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Se eligió una muestra al azar (Muestra 6\_1: 6 días de cultivo, réplica #1) para realizar controles de la reacción sin incubar con DNasa y sin incubar con RT. De esta manera, sobre esta muestra se realizaron 4 tipos de reacciones: 1: con DNasa y con RT, 2: con DNasa y sin RT, 3: sin DNasa y con RT y 4: sin DNasa y sin RT.

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen *McCRISP2* (Número de acceso *GenBank* AY671940) y tres genes de *M. corti* como genes de referencia para normalizar: Tropomiosina 1 de alto peso molecular (*TPM1\_HMW*, Número de acceso *GenBank*: HQ230018.1), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*, tomada de Lalanne (2003)) y ARN ribosomal 18S (*rRNA18S*, Número de acceso *GenBank*: AF119688.1). Para el diseño se utilizó el programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*). Los cebadores diseñados, junto con las características de los amplicones producidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Cebadores diseñados para PCR cuantitativo

Nombre	Secuencia	Largo <sup>A</sup>	Levanta ADN <sup>B</sup>
McTpm1H_qF	CAAGTGGTCGTCTAACTGAAACGT	77	No
McTpm1H_qR	ACGGTTCCTCTCGCTCTCTTC		
McCRisp_a_qF	AGCGAATGCCCTGGAA	62	Sí
McCRisp_a_qR	GGCCTTTTGTGAACCTTGACAC		
McGAPDH_qF	CGTACTGCCGCACAAAATATTATT	80	Si
McGAPDH_qR	CCGTTAAGCTCAGGAATGACCTT		
Mc18S_qF	GGATCAATTGGAGGGCAAGTC	90	Si
Mc18S_qR	CGAGCTTTTAACTGCAGCAACT		
McCrisp_b_qF	GCAATGCAGCGATGTGACA	73	Si
McCrisp_b_qR	GGGCGTATTGACAAGCCATAA		

**A:** Largo del producto de PCR obtenido para ADNc con estos cebadores (en pares de bases).  
**B:** Se indica si amplifica ADNg además del ADNc

Para las reacciones de PCR se utilizó el termociclador en tiempo real *Rotor Gene<sup>TM</sup> 6000* (Corbett Life Science). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µl utilizando el *kit QuantiTect SYBR Green PCR* (QIAGEN) con 0.9µM de cada cebador y una dilución 1/4 de cada ADNc generado.

El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C por 1 minuto y una curva de *melting* desde 60°C a 95°C para determinar la especificidad de la reacción. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa *Rotor Gene<sup>TM</sup> 6000 Series Software* (Corbett Life Science) y el cálculo de los niveles de cambio en la expresión se realizó mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Los productos obtenidos para los distintos días se purificaron con el *kit ISOLATE PCR and Gel* (Bioline) y se clonaron en el vector *pGEM-T-Easy* (Promega) como se describe en el Apéndice 4, transformando la cepa *DH5α*. Se secuenciaron 2 clones de cada estadio del ciclo de vida para verificar que los cebadores diseñados amplificaran específicamente el transcrito McCRISP2.

### 5.1.2. Transcripción in vitro de sondas marcadas con Digoxigenina-UTP (DIG-UTP)

Previamente se clonó en el vector *pGEM-T-Easy* (Promega) la región codificante para la proteína McCRISP2. El inserto se encuentra clonado de tal manera que la transcripción desde el promotor T7 genera transcritos *sense*.

Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico con el *kit ISOLATE Plasmid Mini kit* (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se incubaron toda la noche a 37°C con 5 unidades de la enzima de restricción *Apal* (Fermentas) en un volumen final de 25µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante. Esta enzima digiere el vector entre el promotor T7 y el sitio de inserción del gen de interés y no corta los insertos ligados al vector.

El producto de digestión fue utilizado como molde para la síntesis de la sonda anti-sentido utilizando la ARN polimerasa *SP6*. Las reacciones de marcado se realizaron en 20µl de volumen final, conteniendo *buffer* de transcripción 1X suministrado con la enzima, mezcla de rNTPs con DIG-UTP (concentraciones finales 0.35mM DIG-UTP (*Roche*), 0.65mM UTP, 1mM ATP, 1mM CTP, 1mM GTP, ), 20 unidades de inhibidor de RNasa (*Applied Biosystems*), aproximadamente 1µg de ADN molde y 38 unidades de ARN polimerasa *SP6* (*Promega*). Se incubaron durante 60 min a 37°C y se trataron con 2 unidades de *DNasa RQ1* (*Promega*) durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de LiCl 4M, incubándolos a -80°C durante toda la noche. Se centrifugaron a 12000xg durante 20 minutos a 4°C y se lavó el *pellet* con 1ml de etanol 70%. Se secaron bajo lámpara 10 minutos y se resuspendieron en 200µl de formamida 50%, calentando 10 minutos a 65°C.

Se realizó un *blot* de ARN para verificar la integridad de las sondas y un *dot blot* para cuantificarlas, comparando con una sonda marcada con DIG-UTP de concentración conocida (*Roche*). Para el *blot*, las sondas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nylon (*Hybond N, Amersham*) por el método de transferencia seca. Para la cuantificación se sembraron diluciones seriadas de las mismas en membranas de nylon junto a diluciones seriadas de la sonda de concentración conocida. El ARN se fijó a la membrana por exposición a luz ultravioleta.

Para el revelado, se incubaron las membranas con agitación durante 5 minutos en *Buffer 1* (Apéndice 1), seguido de un bloqueo durante 20 minutos en *Buffer 2* (Apéndice 1). Se realizó un lavado durante 5 minutos en *Buffer 1* y se incubó durante 20 minutos en una dilución 1/1000 en *Buffer 2* de un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (*Roche*). Finalmente, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 minutos en *Buffer 3* y se revelaron mediante incubación con los reactivos cromogénicos NBT y BCIP (*Buffer* de revelado, Apéndice 1)

### 5.1.3. Hibridación *in situ* sobre criocortes.

Se descongelaron los criocortes (Punto 1.4.1) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se fijaron 15 minutos en PFA 4% diluido en PBS y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez. Se permeabilizaron por incubación 30 minutos en PBSTx (Apéndice 1) y 10 minutos en HCl 0,2N. Todas las incubaciones anteriores fueron realizadas a temperatura ambiente. A continuación se prehibridaron los cortes con solución de prehibridación (Apéndice 1) por 10 min a 60°C y, luego de un cambio de solución, durante 120 minutos a 53°C.

Se desnaturalizó la sonda por incubación 2 minutos a 80°C y enfriado rápido en hielo. Se realizó la hibridación con 0.1ng/µl de sonda desnaturalizada en solución de prehibridación sobre el portaobjetos cubierto con *Parafilm* en cámara húmeda a 53°C durante toda la noche. Para desprender el *Parafilm* sin dañar los cortes, se incubó con agitación en abundante SSC 2X precalentado a 53°C. Se realizaron lavados de rigurosidad decreciente durante 20 minutos cada uno a 53°C sobre el portaobjetos con solución 1 y solución 2 (Apéndice 1).

Los cortes fueron lavados a temperatura ambiente 2 veces en *buffer* MAB (Apéndice 1) durante 30 minutos cada vez y se bloquearon durante 1 hora en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. A continuación se incubaron en cámara húmeda durante 90 minutos a 37°C con un anticuerpo monoclonal anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (*Roche*) diluido 1/500 en solución de bloqueo. Se lavaron 6 veces en MABT (Apéndice 1) durante 15 minutos cada vez y se equilibraron 10 minutos en *buffer* AP (Apéndice 1). Se aplicó el reactivo

NBT/BCIP (Apéndice 1) y se incubó en oscuridad hasta la aparición de la señal. Se detuvo la reacción con PBSTw (Apéndice 1), y se fijaron los cortes con PFA 4% en PBS durante 20 minutos. Se lavaron con PBS, se montaron en glicerol 80% diluido en PBS y se fotografiaron en un microscopio *Olympus* modelo BHA con una cámara adaptada (*USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite*).

Todas las soluciones que se describen para la hibridación *in situ* (Apéndice 1) hasta el paso de incubación con el anticuerpo anti-Digoxigenina fueron tratadas previamente con Dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1% durante toda la noche a temperatura ambiente y autoclavadas durante 40 min.

#### 5.1.4. Hibridación *in toto* sobre organismos enteros

Se rehidrataron los organismos almacenados en metanol 100% (Punto 1.4.2) por incubación a temperatura ambiente en metanol 50% y PBSTx (Apéndice 1) durante 10 minutos cada uno. Se trataron con Proteinasa K (Apéndice 1) para permeabilizar los organismos y se fijaron 10 minutos a temperatura ambiente en PFA 4% en PBS. Se lavaron 2 veces durante 5 minutos cada vez en PBSTx y durante 10 minutos en solución de prehibridación (Apéndice 1) diluida 1/2 en PBSTx. Se prehibridaron los organismos durante 10 minutos a 60°C para inactivar la fosfatasa endógena y 2 horas a 56°C en solución de prehibridación.

Se desnaturalizó la sonda durante 5 minutos a 80°C y se enfrió rápidamente en hielo. Para la hibridación se incubaron los organismos toda la noche a 56°C en solución de hibridación precalentada (Apéndice 1). A continuación se realizaron 2 lavados de rigurosidad decreciente durante 30 minutos a 56°C con cada una de las soluciones de lavado precalentadas descritas en el apéndice 1 (Soluciones 1 a 3). A continuación se lavaron 2 veces en MABT (Apéndice 1) durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente y se bloquearon durante 2 horas en solución de bloqueo (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo anti-Digoxigenina (*Roche*) diluido 1/4000 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Se lavaron 6 veces con MABT durante 20 minutos cada vez a temperatura ambiente y se incubaron 10 minutos en *buffer* AP (Apéndice 1) a temperatura ambiente. Se revelaron con reactivo NBT/BCIP (Apéndice 1) siguiendo el desarrollo de color bajo lupa y se fijaron en PFA 4% diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado en PBSTx. Se incubaron en etanol 100% durante 20 minutos y en etanol 50% durante 5 minutos. Se montaron en glicerol 80% en PBS y se fotografiaron un microscopio *Olympus* modelo BHA con una cámara adaptada (*USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite*).

## 5.2. Análisis *temporo – espacial* de la expresión de la proteína McCRISP2

### 5.2.1. Western blot sobre extractos proteicos y medio de cultivo

Se sembraron muestras proteicas obtenidas como se describió en el punto 1.3 en un SDS – PAGE (Punto 2.2) al 15%. Se utilizaron 5µg de proteínas totales del extracto proteico de *M. corti* o de proteínas correspondientes a los productos de excreción – secreción en el medio de cultivo. Se procedió a realizar la transferencia e incubación de anticuerpos como se describió en el punto 2.3, utilizando una dilución 1/1000 del suero anti McCRISP2 producido en conejo y una dilución

1/5000 de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (*Sigma – Aldrich*, N° catálogo: A6154). Se visualizó la reacción mediante quimioluminiscencia

### 5.2.2. Inmunohistoquímica sobre criocortes

Los criocortes realizados como se indica en el punto 1.4.1 se descongelaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron 15 minutos en PFA 4% diluido en PBS a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS a temperatura ambiente y se inactivó la peroxidasa endógena por incubación durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno diluido al 3% en PBS. Se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (Apéndice 1) y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda con suero anti-McCRISP2 diluido 1/500 en solución de bloqueo. Se realizaron 4 lavados en PBS durante 15 minutos cada vez a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (*GE Healthcare*, N° catálogo: NA934 o *Sigma – Aldrich*, N° catálogo: A6154) diluido 1/1000 en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 4 lavados en PBS durante 15 minutos cada uno y un lavado de 2 minutos en *buffer* acetato de sodio 50mM pH5. Se reveló con el reactivo cromogénico 9-etilcarbazol-3-amina (AEC – *Sigma Aldrich* – Número de catálogo A6926) monitoreando el desarrollo de color bajo lupa. Se detuvo la reacción con PBS, se montaron en Glicerol 80% y se fotografiaron un microscopio *Olympus* modelo BHA con una cámara adaptada (*USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite*).

### 5.2.3. Inmunohistoquímica sobre organismos enteros.

En el momento de realizar la inmunohistoquímica, los organismos obtenidos en el punto 1.4.3 fueron rehidratados por incubación en soluciones de concentración decreciente de etanol en PBS. Una vez hidratados, se trataron los organismos con Proteinasa K (20µg/ml en PBS) durante 20 min a temperatura ambiente seguido de un lavado de 1 minuto en PBS. A continuación se incubaron en HCl 1N por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y se lavaron en PBS hasta que el pH fuera de 7.4. Se lavaron dos veces con PBSTx (Apéndice 1) durante 15 minutos cada uno seguido de un lavado de 1 minuto en PBS. Se bloquearon los organismos en solución de bloqueo (Apéndice 1) toda la noche a 4°C. Se incubaron con suero anti-McCRISP2 producido en conejo, diluido 1/500 en solución de bloqueo, durante 2 horas seguido de 6 lavados de 20 minutos cada uno en PBSTw. A continuación se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (*GE Healthcare*, N° catálogo: NA934 o *Sigma – Aldrich*, N° catálogo: A6154) diluido 1/5000 en solución de bloqueo, seguido de 6 lavados de 20 minutos cada uno con PBSTw. Para el revelado se incubaron 5 minutos en *buffer* acetato de sodio 50mM pH 5 y se incubaron con el reactivo cromogénico 9-etilcarbazol-3-amina (AEC – *Sigma Aldrich* – Número de catálogo A6926) hasta la aparición de color. Los organismos fueron montados con glicerol 80% y fotografiados con un microscopio *Olympus* modelo BHA con una cámara adaptada (*USB Eye-Piece Digital Microscope Camera – Dino-Lite*).

Como control positivo se realizó el mismo procedimiento incubando con un suero anti-tropomiosina producido en conejo disponible en nuestro laboratorio

resultados y discusión

### 1. *Genes con dominio SCP/TAPS de Mesocostoides corti*

Como se menciona en la Introducción (punto 3), se conoce la secuencia completa del ARN mensajero *McCRISP2*, mientras que sólo se logró aislar previamente el extremo 3' del ARN mensajero *McCRISP3*. Únicamente se dispone de secuencias parciales de los genes *McCRISP1* y *McCRISP4* (Britos et al., 2007). Para conocer las secuencias de los ARNm parciales se utilizó la estrategia de RACE 5' y 3'.

Por otro lado, la superfamilia de proteínas SCP/TAPS, contiene muchos miembros en distintos organismos. En mamíferos se han encontrado 33 genes conteniendo el dominio SCP/TAPS en conjunción con otros dominios, formando proteínas modulares (Gibbs et al., 2008). En helmintos, también es una gran familia multigénica, habiéndose identificado en el genoma de *Schistosoma mansoni* 28 genes pertenecientes a la superfamilia (Chalmers et al., 2008). Una búsqueda en el genoma de *E. multilocularis* (previo a la anotación y publicación) reveló que en este cestodo se encuentran al menos 9 genes codificantes para miembros de esta superfamilia, uno de ellos presuntamente un pseudogen (EmCRISPH). Por este motivo, para intentar aislar nuevos transcritos pertenecientes a esta superfamilia, se diseñó una estrategia utilizando cebadores degenerados contra un motivo característico.

#### 1.1. Estrategia de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Se diseñaron cebadores específicos para cada una de los transcritos *McCRISP* conocidos parcialmente (Tabla 11, Apéndice 2). En la Figura 10 se muestra un esquema indicando la ubicación de estos cebadores sobre las secuencias de los transcritos parciales alineadas a la secuencia del transcripto *McCRISP2* (único ARN mensajero completo).

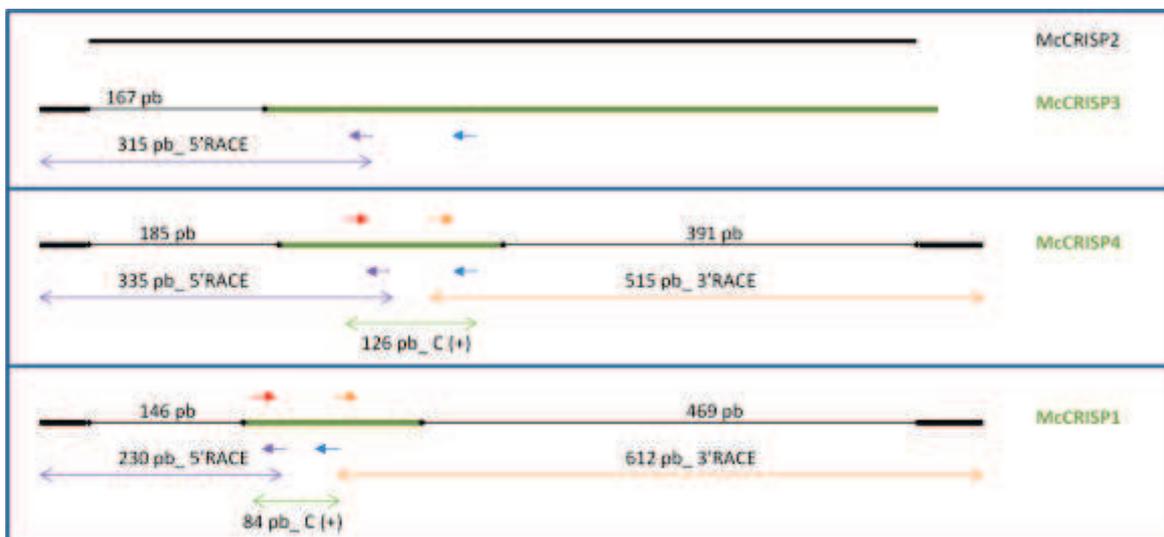


Figura 10: Esquema de la ubicación de los cebadores diseñados para los experimentos de RACE. En verde se muestra la secuencia conocida de cada gen, alineada al transcripto *McCRISP2* completo (Línea negra arriba). A ambos lados con una línea negra fina (◀→), se muestra la región desconocida, con el tamaño estimado de acuerdo a la longitud del mensajero *McCRISP2*. Con líneas negras gruesas (—) se muestran los adaptadores ligados para amplificar los extremos. Con flechas cortas de colores se indica la posición de cada cebador diseñado y con flechas largas en el mismo color, el tamaño de los fragmentos esperados (Rojo: cebador directo externo, Anaranjado: cebador directo interno, Celeste: cebador reverso externo, Violeta: cebador reverso interno). Se indica también el tamaño del control positivo (C+) en el caso de *McCRISP1* y *McCRISP4*.

En esta figura, se indica el tamaño esperado suponiendo que las regiones 3'UTR y 5'UTR de los ARN mensajeros de interés tienen longitudes similares a *McCRISP2*. En los organismos emparentados con información genómica o transcriptómica, la anotación, en el caso de existir, solo indica la región codificante, pero no informan sobre las regiones 5'UTR y 3'UTR. Por este motivo no se conoce si existe conservación en la longitud de estas regiones.

Se siguió en primer lugar una estrategia de *RACE 3'* no comercial, diseñada en nuestro laboratorio, con la cual hemos obtenido resultados muy exitosos (Koziol, 2009; Koziol et al., 2011). En el caso del *RACE 5'* se utilizó el *kit* comercial *GeneRacer™* (Invitrogen) disponible en nuestro laboratorio.

### 1.1.1. Amplificación de los extremos 3'

#### 1.1.1.1. *McCRISP4*

Inicialmente se sintetizó un ADNc (ADNc #2) y se utilizó también un ADNc sintetizado anteriormente (ADNc #1) con el cual se obtuvieron resultados exitosos para otros genes. En la primera reacción, realizada con el ADNc utilizado previamente (ADNc#1), se obtuvieron tres productos de amplificación, de aproximadamente 180, 350 y 500pb (Figura 11, carril 2, flechas abiertas). Se muestra también en esta figura el resultado de los diferentes controles realizados. En el carril 3 se muestra el control en el que se utilizó únicamente el cebador *SmartIII*, en donde se observa una serie de bandas. Estas serían productos de amplificación inespecíficos, pero no se observa ninguna de ellas en la reacción de *RACE* (Carril 2). El control positivo, realizado utilizando el mismo molde que en la reacción de *RACE*, dio el tamaño esperado (aproximadamente 125pb, carril 4, Flecha cerrada) y el control negativo sin molde (carril 5) no mostró productos de amplificación.



Figura 11: ***RACE 3' McCRISP4***. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X, visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. **1:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas*), **2:** Reacción de *RACE*, **3:** Control negativo conteniendo sólo cebador *SmartIII*, **4:** Control positivo, **5:** Control negativo sin ADN molde. Se indican con flechas las bandas obtenidas y sobre las bandas de interés del marcador, su tamaño.

Se repitió la reacción en idénticas condiciones para obtener mayor cantidad de producto y se purificó la banda de 500pb a partir de un gel de agarosa para ser clonada y secuenciada como se describe en el Apéndice 4. El análisis de tres clones reveló que contenían el mismo inserto. Al realizar un *BLASTn* contra la base de datos *nr/nt* del *NCBI*, el primer *hit* es *McCRISP2* (*Score*: 540 bits, *e-value*:  $4 \times 10^{-150}$ , *Identidad*: 87%). Esto es esperable ya que presenta homología de secuencia a lo largo de toda la región 3', que es desconocida para *McCRISP4*. El segundo *hit* es *McCRISP4*. En este caso, la homología ocurre sólo a nivel de los 61pb conocidos desde la región donde hibrida el cebador diseñado en este trabajo. En la Figura 12 se muestra el alineamiento de los tres clones obtenidos junto con el final del transcripto *McCRISP4* publicado (a partir de la región donde se diseñaron los cebadores para 3'RACE). Se observan 7 *missmatches* entre estas secuencias. Posibles explicaciones para esto sería que este sea un nuevo transcripto surgido de una duplicación reciente, por lo que presenta alta homología con *McCRISP4*; que la polimerasa haya cometido errores durante la reacción de amplificación (aunque no se esperan tantos errores dada la longitud del fragmento) o que se deba a polimorfismos existentes en las distintas tandas de organismos obtenidos.

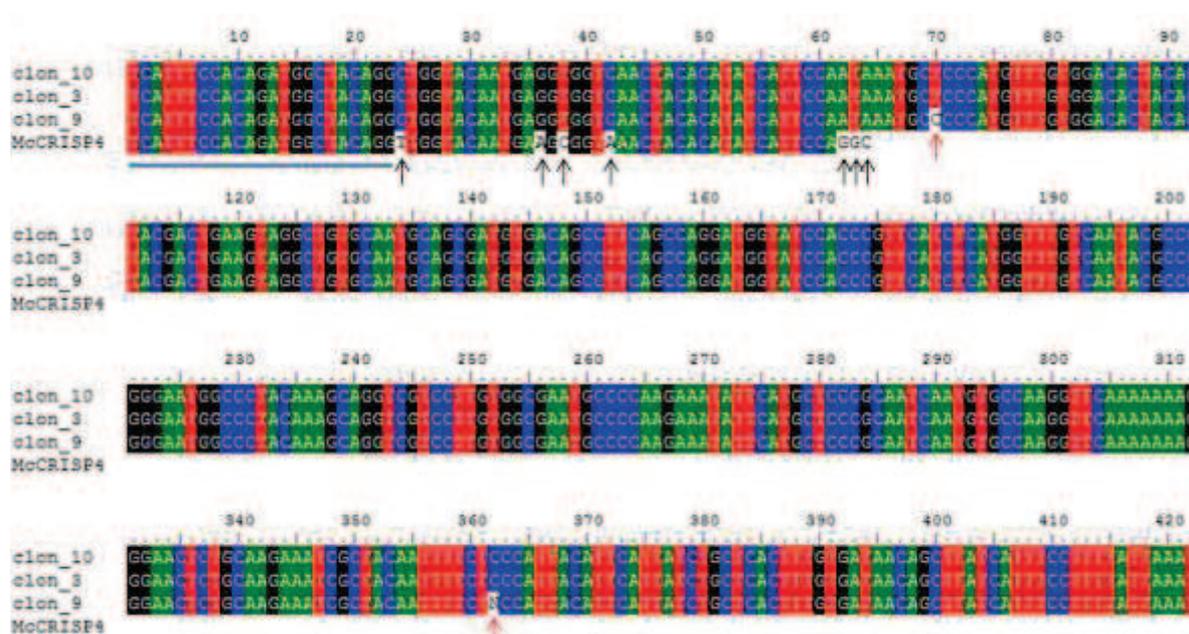


Figura 12: Alineamiento de los insertos *McCRISP4-500* con el final de la secuencia *McCRISP4* original. Realizado con el programa *ClustalX* (parámetros por defecto). Con flechas negras se muestran los *missmatches* de las secuencias obtenidas con la secuencia previamente publicada. Con flechas rojas se muestran dos *missmatches* entre las secuencias obtenidas ambos en el clon número 9 (cromatograma de menor calidad). La línea azul señala el cebador directo específico utilizado.

#### 1.1.1.2. *McCRISP1*

Para *McCRISP1*, en el primer intento se utilizó el ADNc sintetizado en este trabajo (ADNc #2) (a partir de tetratiridios) pero no se obtuvieron resultados del tamaño esperado. Se obtuvo una banda de aproximadamente 200pb (Figura 13, carril 1, indicado con flecha abierta), que dada la ubicación del cebador utilizado no sería una proteína con dominio SCP/TAPS, ya que no llegaría

a cubrir los motivos consenso descritos para la superfamilia (motivos CRISP1 y CRISP2, ver el punto 2.1.1 de la sección “Introducción”). Sí se observa la banda de aproximadamente 85pb del control positivo (carril 4, flecha rellena). Esto podría indicar que las condiciones de la reacción de PCR con el cebador específico y el cebador *SmartIII* no fueron adecuadas o que hubo un problema con la unión del adaptador *CDS* al extremo 3’ de los ARNm.



Figura 13: **RACE 3’ McCRISP1**. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X, visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. **1:** Reacción de *RACE*, **2:** Control negativo conteniendo solo cebador *SmartIII*, **3:** Control positivo, **4:** Control negativo sin ADN molde. **5:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas*). Se indican con flechas las bandas obtenidas y sobre las bandas de interés del marcador, su tamaño.

Se realizaron varios intentos para la amplificación con este ADNc cambiando la temperatura de hibridación de cebadores y la cantidad de molde utilizado (Tabla 1, sección “Materiales y Métodos”). En ningún caso se obtuvo producto de amplificación, aunque sí se observaron los productos del control positivo (no se muestra). Se decidió testear si el problema se encontraba en la unión del adaptador *CDS* al extremo 3’, repitiendo la reacción para *McCRISP4* en idénticas condiciones a la reacción realizada con resultado exitoso (punto 1.1.1.1, sección “Resultados y Discusión”). Tampoco fue posible amplificar este gen, por lo que se concluye que el ADNc no se generó correctamente. Para descartar que el resultado negativo se deba a que *McCRISP1* no se expresa en el estadio larvario (y que la banda obtenida en el control sea una amplificación inespecífica), se intentó amplificar el gen *TPM1* de expresión constitutiva, sin obtener resultados (no se muestra).

Finalmente, cuando se utilizó el ADNc #1 como molde se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 350 y 500pb (Figura 14, carril 6, marcado con flecha abierta). Se cambió además en este caso la enzima utilizada (*U-Taq DNA Polymerase – SBS*). El hecho que la reacción con el ADNc#2 no funcionase tampoco con esta enzima (Figura 14, carril 1), y si lo hiciera con el ADNc#1 confirma la hipótesis de que hubo un problema durante la síntesis del ADNc#2 en la unión del adaptador. En ambas reacciones se observan los controles positivos (carriles 4 y 9, marcado con flecha cerrada). En el control positivo para el ADNc #2, además de la banda de aproximadamente 75pb correspondiente al transcripto *McCRISP1*, se observa una banda de entre 200 y 300pb (señalada con una punta de flecha). En el análisis del genoma de *E.*

*multilocularis* buscando genes con dominio SCP/TAPS se observó que se conserva la posición de los intrones (no se muestra) y lo mismo ocurre en el caso de *Schistosoma mansoni* (Chalmers et al., 2008). Los cebadores utilizados en el control positivo flanquean un intrón (no se muestra, el límite entre exones se encuentra 16pb después del final del cebador directo), por lo que la banda de mayor tamaño observada en el control positivo puede deberse a amplificación de ADNg que pudiera haber quedado remanente durante la preparación del ARN. Para confirmarlo habría que secuenciar el producto de PCR.

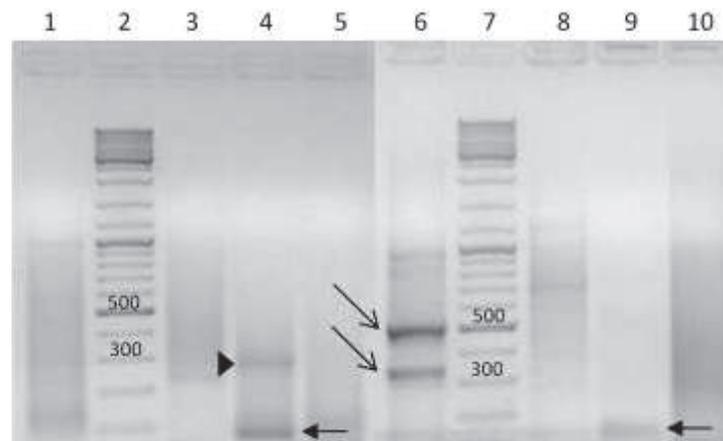


Figura 14: Reacciones de RACE y controles para *McCRISP1* utilizando diferentes moldes. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X, visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. **Carriles 1 a 5: ADNc#2.** 1: Reacción de RACE, 2: Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas*), 3: Control negativo sin cebador directo, 4: Control positivo, 5: Control negativo sin molde. **Carriles 6 a 10: ADNc#1.** 6: Reacción de RACE, 7: Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas*), 8: Control negativo sin cebador directo, 9: Control positivo, 10: Control negativo sin molde. Se indican con flechas las bandas obtenidas y sobre las bandas de interés del marcador, su tamaño.

Las bandas obtenidas en la reacción de RACE se purificaron desde el gel y se clonaron para secuenciar como se describe en el Apéndice 4. Se analizó la secuencia de un clon (#5) para la banda de 500pb mediante *BLAST*. El análisis de *BLASTn* en el sitio del *NCBI* con el algoritmo de búsqueda “*highly related sequences*” y la base de datos *nr/nt* no produce ningún resultado. Cuando se cambia el algoritmo a “*somewhat similar sequences*” se producen alineamientos, pero con secuencias codificantes para proteínas hipotéticas, o distintos clones de librerías de varios organismos. No presenta homología con la secuencia parcial de *McCRISP1* publicada. Al restringir la búsqueda a cestodos dan alineamientos cortos (con bajo *E-value*), correspondientes a dos secuencias de ARNm de *Taenia asiatica* (secuencias obtenidas a partir de una librería de ESTs) y la región de ADNg correspondiente al ARNr5S de *Proteocephalus macrocephalus*. En esta búsqueda aparece la secuencia *McCRISP1*, pero con homología únicamente a nivel del cebador. Al hacer un *BLASTn* con los genes anotados del género *Echinococcus* en *GeneDB* se obtienen alineamientos con proteínas hipotéticas conservadas (según la anotación de esa base de datos). Sin embargo, al hacer *BLASTp* con estas secuencias proteicas en la base de datos del *NCBI* no se obtiene ningún resultado.

Además, la secuencia obtenida no posee las características estructurales del dominio SCP/TAPS,

como se comprobó al analizarla en busca de dominios conservados utilizando la herramienta *Conserved Domain Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Gran parte de la secuencia fue eliminada por la herramienta para la búsqueda ya que constituían regiones con un sesgo composicional.

Se decidió realizar un análisis de restricción con las construcciones obtenidas para analizar si alguna presentaba un inserto diferente. Se utilizó la enzima *AatII*, que digiere una vez el inserto del clon #5 (posición 402 de 461pb clonados) y una vez al vector en la posición 20 (40pb antes del sitio de inserción del producto de PCR). De esta manera se espera obtener para insertos idénticos al obtenido, una banda de aproximadamente 450pb y otra de aproximadamente 3000pb. En el caso del clonado en la dirección opuesta, una banda de aproximadamente 100pb y otra de aproximadamente 3350pb.

En todos los casos se observa el mismo patrón de digestión (Figura 15), obteniéndose siempre una banda un poco menor a 500pb y una de aproximadamente 3000. Se concluye que todos los clones obtenidos contienen el mismo inserto. La única preparación que presenta un patrón diferente es la preparación a partir de una colonia azul sin inserto (carril 13, Figura 15)

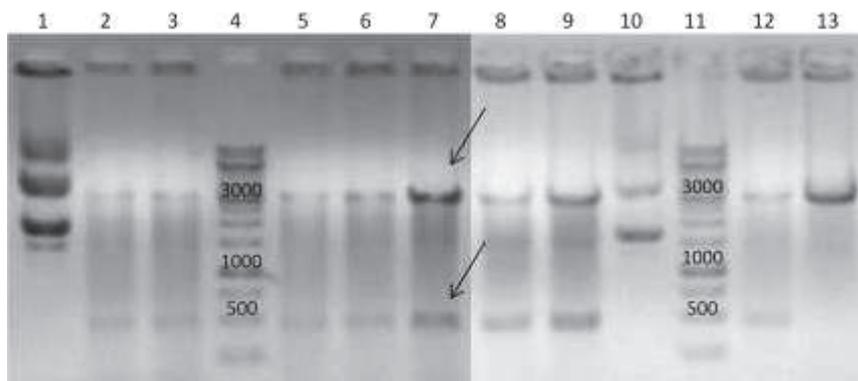


Figura 15: **Análisis por restricción de los plásmidos recombinantes obtenidos con el inserto *McCRISP1\_500*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X, visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. Se sembraron 10 $\mu$ l de cada digestión y 1.5 $\mu$ l de plásmido sin digerir. **1:** Plásmido #7 sin digerir, **2:** Plásmido #1 digerido, **3:** Plásmido #2 digerido, **4:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas*), **5:** Plásmido #3 digerido, **6:** Plásmido #4 digerido, **7:** Plásmido #5 digerido, **8:** Plásmido #6 digerido, **9:** Plásmido #7 digerido, **10:** Plásmido #10 sin digerir (colonia azul), **11:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas*), **12:** Plásmido #8 digerido, **13:** Plásmido #10 (colonia azul) digerido. Las flechas en el carril 7 (clon secuenciado) indican las bandas de 3000pb y 450pb obtenidas para todos los clones analizados.

Las secuencias de dos clones obtenidos con la banda de 350pb (clones #1 y #6) fueron idénticas entre sí, e idénticas a los primeros 350pb de la secuencia *McCRISP1-500pb* (Figura 16). Dado que la secuencia de 500pb presentó un sesgo composicional, con un alto contenido en A (como lo sugiere una inspección visual del alineamiento), puede ser que el oligo-dT utilizado en la retrotranscripción haya hibridado parcialmente al final de esta región de ADN, dando el producto de 500pb y en medio de la misma, produciendo la banda de 350pb. También podría ocurrir que el ARNm tuviera un plegamiento muy estable que se mantuvo durante la síntesis de ADNc generando un ADNc más corto a partir del mismo ARNm.

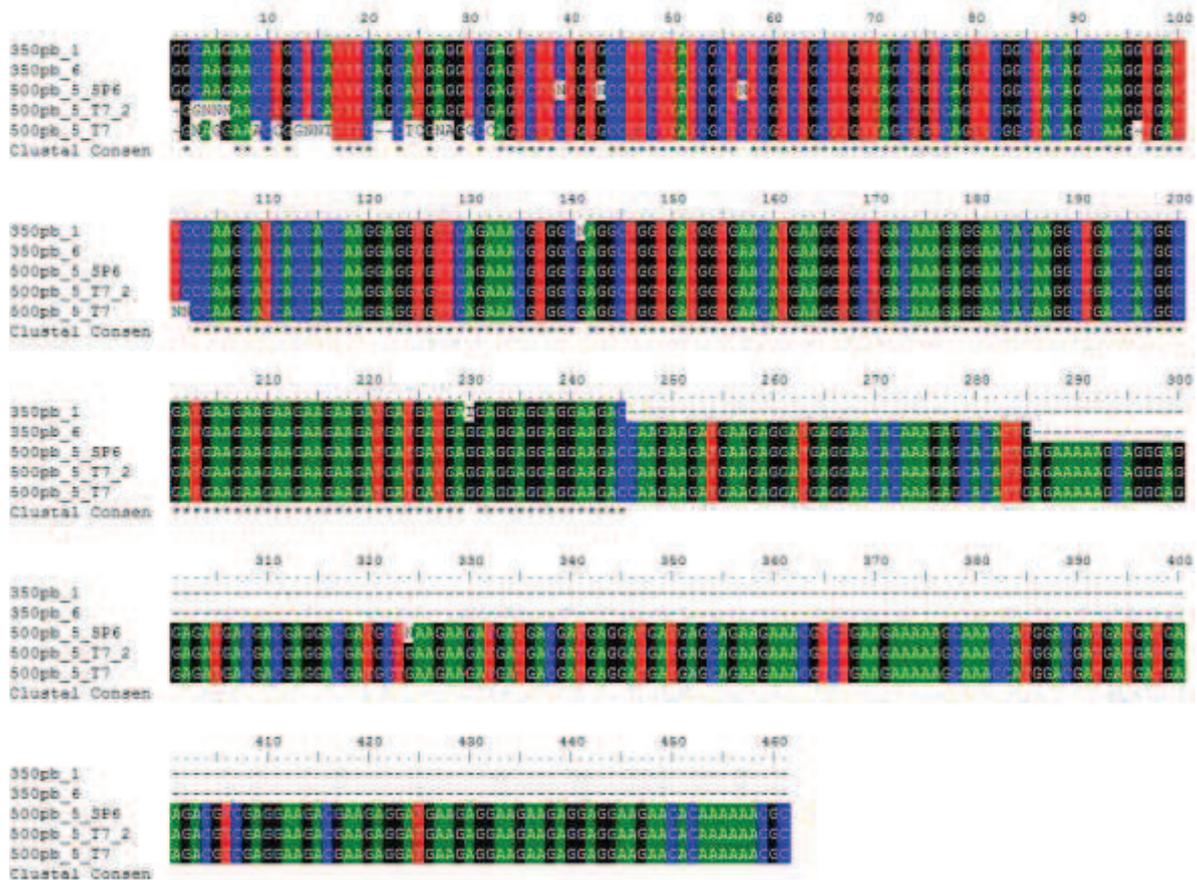


Figura 16: Alineamiento de los insertos *McCRISP1-350* y *McCRISP1-500* obtenidos. Se incluyó la banda *McCRISP1-350*pb (clones 1 y 6) y la banda *McCRISP1-500*pb (clon 5, secuenciado con T7 dos veces y SP6). El alineamiento se realizó con el programa *ClustalX* con los parámetros por defecto,

Posteriormente se utilizó otro ADNc obtenido a partir de ARN de tetratiridios (ADNc#3), con el cual previamente se habían amplificado los genes *TPM1* y *TPM2* (Kozioł et al., 2011). En este caso tampoco se obtuvieron resultados.

En todos los casos se utilizó ARN obtenido de tetratiridios porque ese fue el estadio a partir del cual se aisló el transcripto *McCRISP1* inicialmente (Britos, 2000). Además, el control positivo, dio en todas las reacciones realizadas. Si bien su tamaño es muy pequeño, se distinguen claramente de dímeros de cebadores. Otra alternativa es que el cebador diseñado no sea óptimo para la amplificación de este transcripto.

Para lograr amplificar el extremo 3' de este gen se podría partir de un *pool* de ARN de diferentes estadios del ciclo de vida (ver punto 1.2 de esta sección), evitando los resultados negativos que se obtienen si este gen no se expresa en el estadio estudiado. Además sería deseable diseñar nuevos cebadores, con una temperatura de hibridación menor.

### 1.1.2. Amplificación de los extremos 5'

Para la amplificación de los extremos 5' de los transcritos de interés, se utilizó también ARN de tetratiridios como molde para la síntesis de un ADNc con un adaptador en el extremo 5' (*GeneRacer kit – Invitrogen*). En primer lugar, como lo recomienda el fabricante, se realizó un PCR *Touchdown*, para asegurar una mayor especificidad. Se realizó con la enzima *AccuPrime Pfx (Invitrogen)* lo que permite a su vez una PCR *Hot Star*. Las reacciones realizadas para los tres transcritos no produjeron ningún producto de amplificación (no se muestra), incluso cuando se variaron las cantidades de ADN molde (ver Tabla 2, sección “Materiales y métodos”). Se decidió entonces cambiar de enzima, por una *Taq DNA* polimerasa (*U-Taq DNA Polymerase – SBS*) y a un ciclado estándar, aunque tampoco se obtuvieron resultados con este ADNc. Se comenzó nuevamente, realizando la retrotranscripción con un nuevo ARN obtenido de tetratiridios. Para las reacciones de PCR a partir de este ADNc se utilizó la enzima *Long PCR Enzyme mix (Fermentas)*. En este caso se obtuvo una banda de tamaño similar al esperado para *McCRISP3* (Figura 17, Panel A, marcado con flecha abierta).

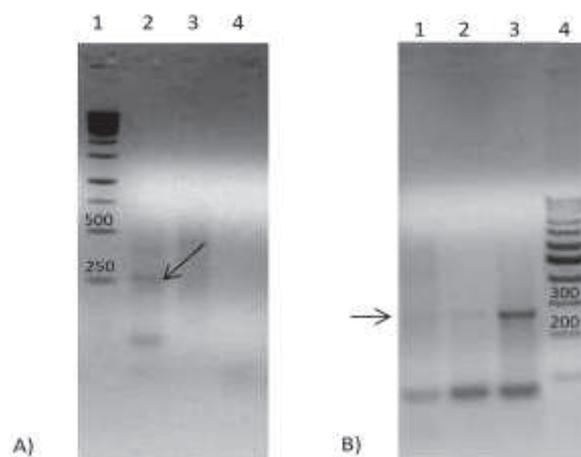


Figura 17: **RACE 5' del transcripto *McCRISP3***. Electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X, visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta A) **Reacción de RACE y controles**: **1**: Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas*), **2**: Reacción de RACE, **3**: Control negativo sin cebador reverso, **4**: Control negativo sin ADN molde. B) **Reamplificación con distintas cantidades de ADN molde**. **1**: Reacción idéntica a la realizada en el RACE (Carril 2, Panel A); **2**: Reacción utilizando como molde PCR1 diluida, **3**: Reacción utilizando PCR2 diluida, **4**: Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas*). Se indican con flechas las bandas de tamaño esperado y sobre las bandas de interés del marcador, su tamaño.

Para aumentar la cantidad de producto de amplificación se ensayó la reacción en las mismas condiciones, pero variando la cantidad de ADN molde (PCR1 diluida 1/10 y PCR2 diluida 1/10, ver Tabla 2, sección “Materiales y métodos”). En el caso de la reamplificación de la PCR 2 se obtuvo mayor cantidad de producto (Figura 17, Panel B, carril 3). Esta banda se purificó desde el gel y se clonó para secuenciar como se describe en el Apéndice 4.

El análisis inicial de dos clones secuenciados (#4 y #10) reveló que ambos insertos eran idénticos aunque ligadas al vector en direcciones opuestas. La única región de homología con la secuencia del transcripto *McCRISP3* previamente publicada ocurre a nivel del cebador específico

diseñado (no se muestra). El análisis de *BLASTn* con el algoritmo optimizado para “*highly related sequences*” no produce ningún resultado. La homología a nivel del cebador con *McCRISP3* se obtiene cuando se usa el algoritmo “*somewhat similar sequences*”. En este caso, restringiendo la búsqueda a cestodos se obtienen únicamente alineamientos cortos (20 nucleótidos) con secuencias variadas.

Se realizó el análisis por restricción de otros clones con la enzima *Avall*, que digiere al vector dos veces (posiciones 1548 y 1770) y al inserto secuenciado en la posición 188 de 261pb. En la Figura 18 se muestra el resultado de la digestión. Se espera obtener tres bandas para insertos idénticos a los secuenciados (1493, 1561 y 202pb si se inserta en la dirección del clon #10 y 1378, 1676 y 202 si se inserta en la dirección del clon #4) o dos bandas para los insertos diferentes (de 3074 y 202pb si no presentan un sitio para *Avall*). Se muestran con flechas rojas los clones ya secuenciados (clon #4, carril 8 y clon#10, carril 17, Figura 18). Con flechas negras se observan los clones que presentan un patrón de digestión similar al clon #4, y con flechas verdes los clones que presentan un perfil diferencial (clon #3, carril 6; clon #5, carril 11 y clon #6, carril 13, Figura 18).

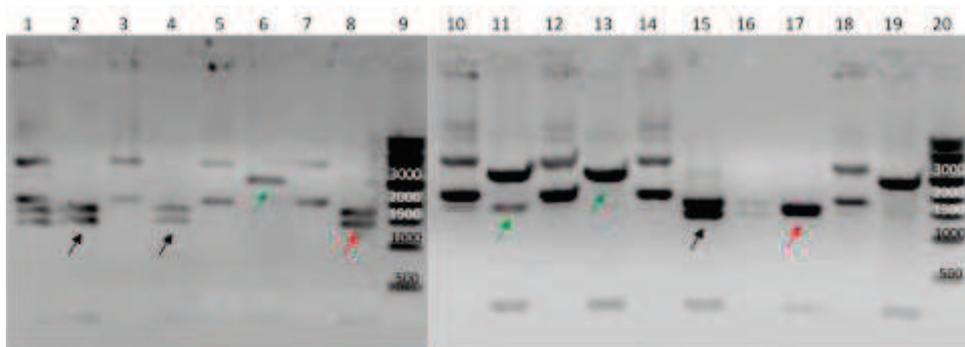


Figura 18: **Digestiones de clones *McCRISP3*-250pb con *Avall***. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X visualizado por tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. **1 y 2:** Plásmido #1 sin digerir y digerido, **3 y 4:** Plásmido #2 sin digerir y digerido, **5 y 6:** Plásmido #3 sin digerir y digerido, **7 y 8:** Plásmido #4 sin digerir y digerido, **9 y 20:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, New England Biolabs*), **10 y 11:** Plásmido #5 sin digerir y digerido, **12 y 13:** Plásmido #6 sin digerir y digerido, **14 y 15:** Plásmido #7 sin digerir y digerido, **16 y 17:** Plásmido #10 sin digerir y digerido, **18 y 19:** Plásmido a partir de colonia azul (sin inserto) sin digerir y digerido. Se sembraron 10µl de cada digestión y 1µl de plásmido sin digerir. Las flechas rojas indican los clones secuenciados, las negras indican los clones con un perfil idéntico a los secuenciados y las verdes las que presentan un perfil de restricción diferencial. Sobre las bandas de interés del marcador se muestra su tamaño.

De estos, se enviaron a secuenciar los clones #3 y #5. Las secuencias obtenidas fueron distintas entre sí, y a las obtenidas previamente. Sin embargo, ambas presentaron homología con *McCRISP3* únicamente a nivel del cebador específico diseñado. El resto de los alineamientos corresponden a secuencias variadas de distintos organismos. La búsqueda de dominio SCP/TAPS con la herramienta *Conserved Domain Search* mostró que ninguno de los amplicones obtenidos lo presentaba.

Se intentó amplificar con ambos ADNc el extremo 5' del gen *TPM1*, de expresión constitutiva, pero tampoco se obtuvieron resultados. Esto lleva a concluir que durante la síntesis de los ADNc no se ligaron correctamente a los adaptadores, en particular el adaptador ligado en el extremo

5'. Esta estrategia implica una gran cantidad de reacciones enzimáticas, dada la naturaleza del extremo 5' de los ARNs (desfosforilación de los extremos 5' de ARNm parciales y ARN total, *Decapping* de los ARNm con el extremo 5' no degradado, ligación del adaptador 5' y retrotranscripción). Si alguno de estos pasos no ocurre adecuadamente o si el ARN de partida se encuentra degradado en su extremo 5', no se obtiene ADNc con el adaptador ligado.

### 1.2. Estrategia utilizando cebadores degenerados para el motivo conservado PPA

Debido a que la estrategia de *RACE* (tanto 5' como 3') no fue totalmente exitosa, y sabiendo que en otros organismos cercanos existen más de cuatro genes con dominio SCP/TAPS, se intentó amplificar nuevos transcritos utilizando una combinación del *RACE* 3' y de cebadores degenerados. En base al análisis de secuencias proteicas pertenecientes a la superfamilia SCP/TAPS de los cestodos *E. multilocularis* y *M. corti*, se observó la presencia de un motivo conservado, denominado en este trabajo PPA. El alineamiento de la región N-terminal de las secuencias proteicas analizadas se muestra en la Figura 19. Un cebador específico contra esta región fue utilizado para el aislamiento de los transcritos conocidos *McCRISP* de *M. corti* por Britos et al. (2007). Si bien éste no es un motivo estrictamente conservado, en cuanto a que presenta variaciones, es la región más cercana al extremo N-terminal de la proteína que presenta mayor conservación.

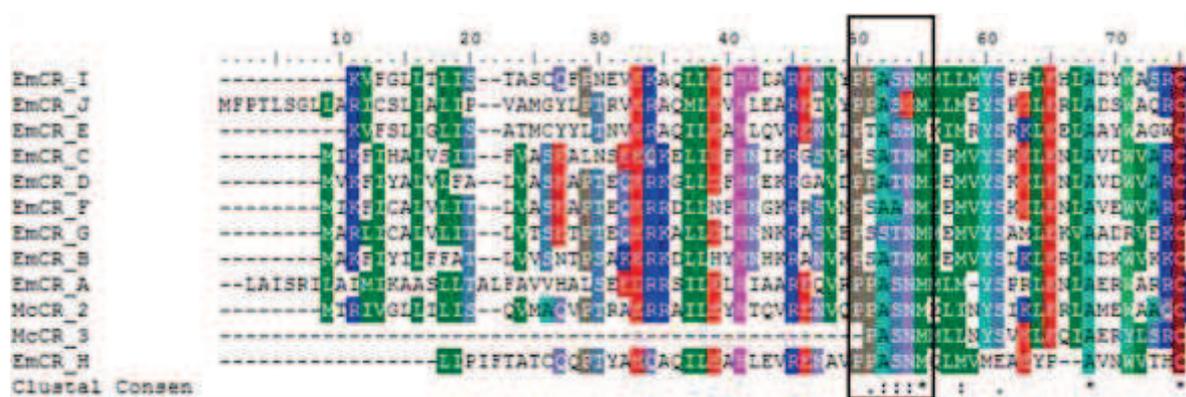


Figura 19: Alineamiento de la región N-terminal de proteínas con dominio SCP/TAPS de cestodos. Realizado con el programa *ClustalX* con los parámetros por defecto. Con un recuadro negro se muestra el dominio PPA utilizado para el diseño de cebadores degenerados. Em: *Echinococcus multilocularis*, Mc: *Mesocestoides corti*.

Un análisis de esta región muestra que el motivo sería P-(P<sub>7</sub>S<sub>4</sub>T<sub>1</sub>)-(A<sub>11</sub>S<sub>1</sub>)-(S<sub>7</sub>T<sub>4</sub>A<sub>1</sub>)-(N<sub>11</sub>D<sub>1</sub>)-M, siendo los números luego de cada aminoácido la cantidad de secuencias proteicas que presentan este aminoácido en la posición dada. En la Tabla 6 se muestran todos los motivos encontrados y los cebadores degenerados que se diseñaron para amplificarlo.

Tabla 6: Cebadores diseñados para distintos motivos PPA encontrados en las secuencias proteicas analizadas

Motivo	Hits <sup>1</sup>	Nº <sup>2</sup>	Cebador	Nombre <sup>3</sup>	Tm <sup>4</sup> MAX/Min	Grado <sup>5</sup>	
PPASNM	EmI, EmH, EmA, Mc2, Mc1,	5	CCN CCN GCN TCN AAY ATG	A	57.2 / 45.8	512	
			CCN CCN GCN AGY AAY ATG	B		256	
PPASDM	EmJ	1	CCN CCN GCN TCN GAY ATG	C	59.4 / 48.0	512	
			CCN CCN GCN AGY GAY ATG	D		256	
PPATNM	EmD	1	CCN CCN GCN ACN AAY ATG	E	57.2 / 45.8	512	
PSAANM	EmF	1	CCN TCN GCN GCN AAY ATG	F	57.2 / 45.8	512	
			CCN AGY GCN GCN AAY ATG	G		256	
PSATNM	EmC, EmB	2	CCN TCN GCN ACN AAY ATG	H	54.9 / 43.5	512	
			CCN AGY GCN ACN AAY ATG	I		256	
PTASNM	EmE	1	CCN ACN GCN TCN AAY ATG	J	54.9 / 43.5	512	
			CCN ACN GCN AGY AAY ATG	K		256	
PSSTNM	EmG	1	CCN TCN TCN ACN AAY ATG	L	57.2 / 45.8	512	
			CCN TCN AGY ACN AAY ATG	M		256	
			CCN AGY TCN ACN AAY ATG	N		57.6 / 41.2	256
			CCN AGY AGY ACN AAY ATG	O		128	

1: Secuencias proteicas que presentan el motivo. 2: Número de secuencias que presentan el motivo. 3: Nombre dado al cebador en este trabajo. 4: Temperatura máxima y mínima de hibridación de cebadores (estimado en: [http://www.biophp.org/minitools/melting\\_temperature/demo.php?formula=basic](http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?formula=basic)). 5: Grado de degeneración (Calculado multiplicando el índice de degeneración de cada base no específica en el cebador: N=4, R=Y=2)

En un principio se deseó amplificar nuevos transcritos, independientemente del estadio del desarrollo en que se expresaran. Por lo tanto se realizó un *pool* del ARN extraído de organismos en distintos estadios del desarrollo (desde tetratiridio hasta gusano segmentado) para obtener un ADNc representativo de todos los estadios. A partir de este ADNc se realizaron reacciones de PCR utilizando cada uno de los 15 cebadores diseñados (Figura 20).



Figura 20: PCR con cebadores degenerados. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X visualizado mediante tinción con *GelRed* y exposición a luz ultravioleta. 1 – 2 y 4 - 16: PCR con los cebadores A – O, 17: Control negativo sin molde, 18: Control negativo sin cebador directo, 19: Control positivo, 3 y 20: Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder, Fermentas*)

En todos los casos se observan varias bandas de amplificación. Esto es un resultado esperado para PCRs utilizando cebadores degenerados. Se procedió a la purificación, ligación y transformación de los amplicones como se describe en el punto 3.3 de la sección “Materiales y métodos”. Se obtuvieron en una primera transformación un total 67 colonias. Se hizo un PCR a partir de éstas colonias con cebadores T7 y SP6, flanqueantes al sitio de inserción del fragmento clonado. El resultado para las 67 colonias de la primera transformación se muestra en la Figura 21. Se repitió este procedimiento en una segunda transformación en la que se obtuvieron 83 colonias (no se muestra)

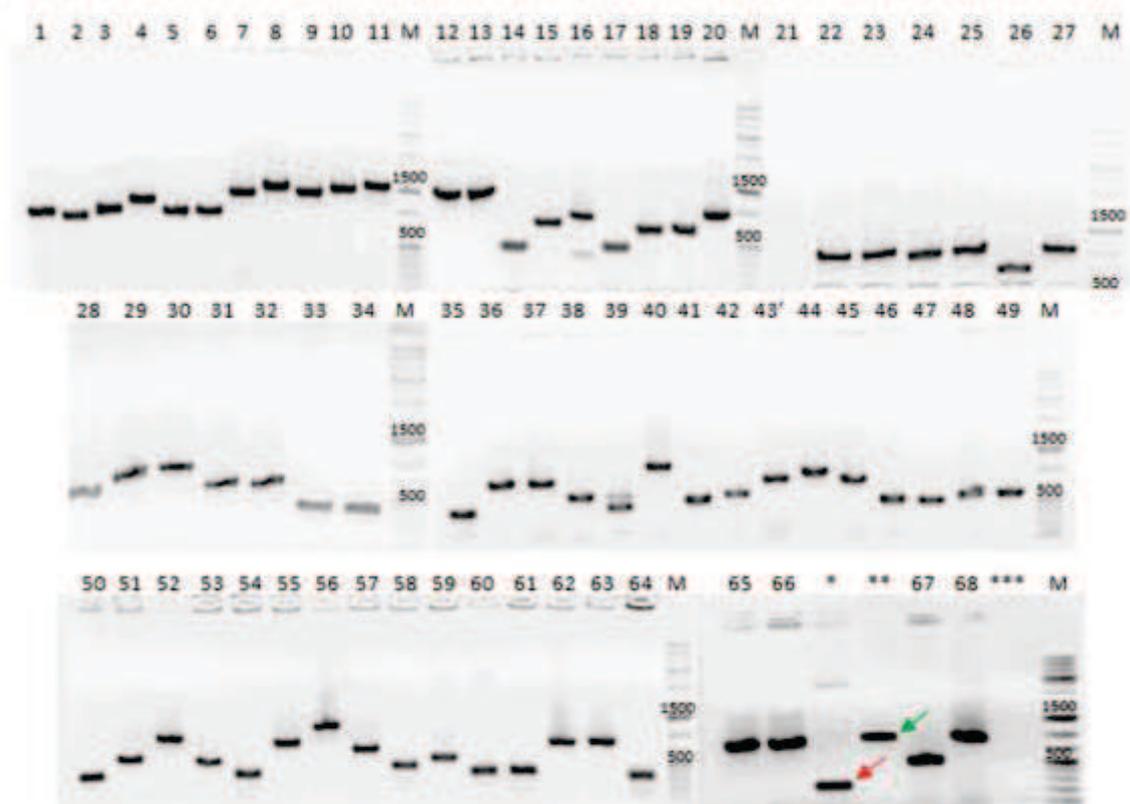


Figura 21: **PCR de colonia rastreo PPA.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X visualizado mediante tinción con *GelRed* y exposición a luz ultravioleta. Sobre cada carril se indica el número de la colonia. Con la letra **M** se indican los carriles donde se cargó el Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, Fermentas*). \*: Control negativo, colonia azul; \*\*: Control positivo, plásmido con inserto de 560pb, \*\*\*: Control negativo, agua: Se indican con flechas las bandas correspondientes al control del plásmido conteniendo inserto de 560pb (verde) y el control de plásmido sin inserto (rojo). Sobre las bandas de interés del marcador se muestra su tamaño.

De acuerdo a los tamaños obtenidos, se seleccionan algunas colonias de las cuales extraer el ADN plasmídico para enviar a secuenciar (Apéndice 4). En la Tabla 7 se resumen los clones secuenciados y su resultado. En la parte superior se muestran los resultados para la transformación mostrada en la Figura 21 y en la parte inferior las secuencias obtenidas para la segunda transformación procesada en iguales condiciones.

Tabla 7: Clones secuenciados para obtener nuevos genes conteniendo el dominio SCP/TAPS

Clones	Cebado	Resultado
7 a 11	SP6	Idénticas entre sí. BLASTx: Transportador de glutamato
22 a 27	SP6	Idénticas entre sí. Presentan el poli T al principio.
22_1	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E value</i> = $5.2 \times 10^{-14}$ ).
26_1	T7	Secuencia de mala calidad
27	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E value</i> = $1.5 \times 10^{-17}$ )
19	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E value</i> = $2.0 \times 10^{-13}$ )
X	T7	Presenta el poli T al principio
65	SP6	Presenta el poli T al principio
62 y 63	SP6	Idénticas entre sí y al principio del clon 22_1.
65 y 66	T7	Idénticas entre sí y al clon 22_1.
1, 2 15 y 17	T7	Idénticas entre sí. BLASTx: <i>Heat Shock protein 86/90</i>
4	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E value</i> = $2.6 \times 10^{-11}$ )
8_2	T7	BLASTx: Lactato deshidrogenasa
18	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E-value</i> = 0.04). Es más corta
22_2	T7	BLASTx: NADH deshidrogenasa al principio y Pepsina A al final
23, 24 y 55	T7	Idénticas entre sí y al clon 22_1
26	T7	Idéntica al clon 18.
53	T7	BLASTx: Tirosin-quinasa o Cisteinil-tRNA sintetasa
83	T7	Dominio <u>SCP/TAPS</u> ( <i>CD Search_ E value</i> = $5.7 \times 10^{-20}$ ). Es más larga

Mediante esta estrategia se aislaron 6 nuevos transcritos codificantes para proteínas con dominio SCP/TAPS (denominados PPA22\_1, PPA27, PPA19, PPA4, PPA18 y PPA83, ver Tabla 7). La mayoría de los transcritos se aislaron con los cebadores diseñados para los motivos PSATNM y PTASNM. Se muestra en la Figura 22 el alineamiento a nivel nucleotídico de los transcritos

obtenidos. Resta analizar más clones, para intentar aislar transcritos con los demás motivos, principalmente con el motivo PPASNM, el cual se encuentra en la mayoría de las secuencias proteicas de cestodos analizadas (5 de 11 incluidas McCRISP1 y McCRISP2, ver Tabla 6).

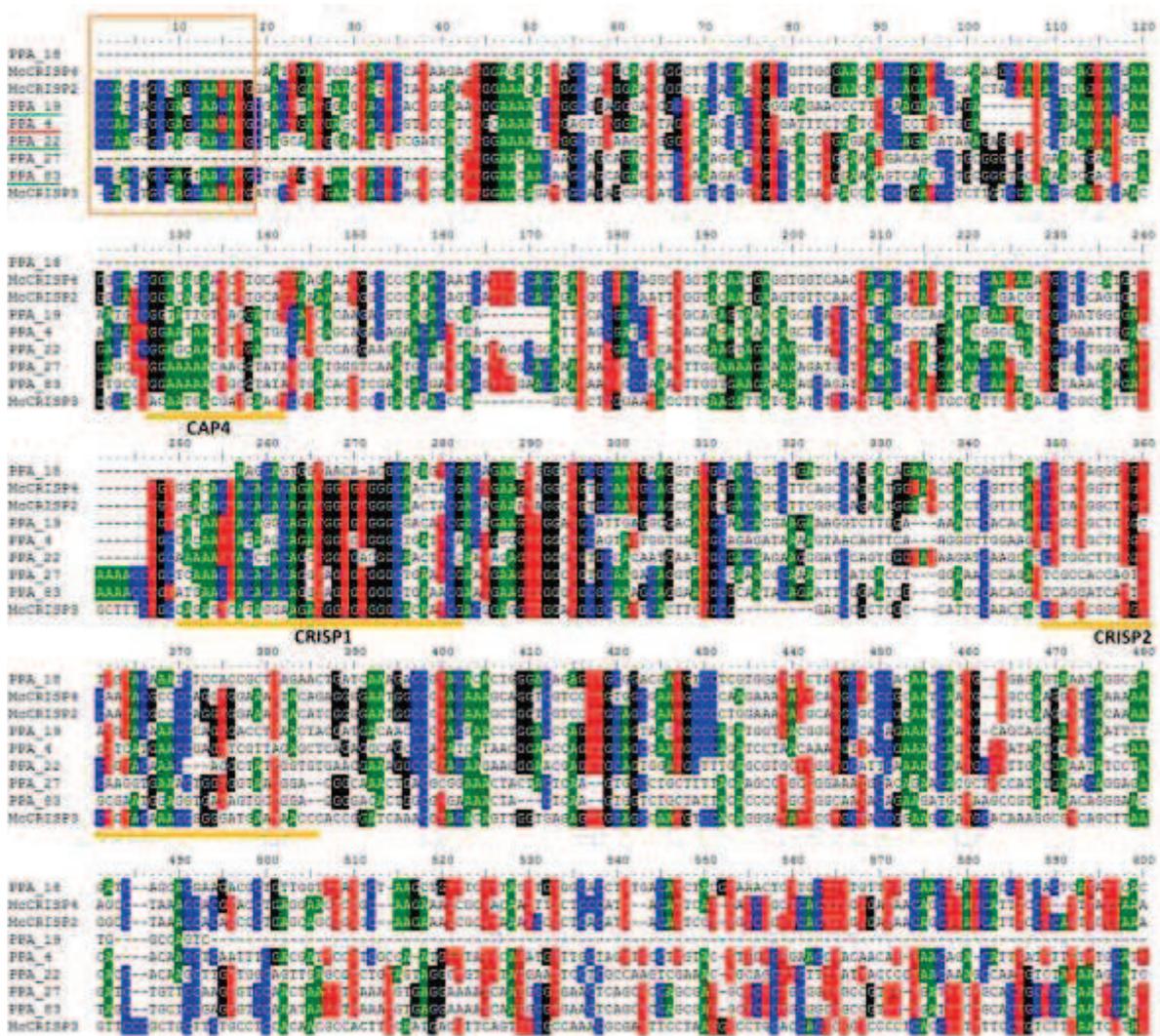


Figura 22: Alineamiento de los nuevos transcritos codificantes para proteínas con dominio SCP/TAPS obtenidos. El alineamiento se realizó con el programa *ClustalX* con los parámetros por defecto. Se muestra con líneas amarillas las regiones codificantes para los motivos conservados. Con un recuadro naranja se marcan la región correspondiente a los cebadores. El nombre subrayado con verde indica que corresponde a un cebador PSATNM (CCN TCN/AGY GCN ACN AAY ATG). El nombre subrayado con rojo indica que corresponde a un cebador PTASNM (CCN ACN GCN TCN/AGY AAY ATG). Las bases con mayor conservación se muestran coloreadas. Se incluyeron además de los transcritos aislados en este trabajo (estrategia de cebadores degenerados (denominados PPA\_#) y RACE3' de *McCRISP4*), los transcritos con extremo 3' conocido previamente (*McCRISP2* y *McCRISP3*). No se incluyó *McCRISP1* debido a su corta longitud.

### 1.3. Resumen de resultados y Discusión general

Como primer objetivo de este trabajo se pretendió completar los transcritos parciales codificantes para proteínas con dominio SCP/TAPS conocidos, así como identificar nuevas secuencias codificantes para proteínas pertenecientes a ésta superfamilia en *M. corti*. Este objetivo, además de contribuir al conocimiento de nuevos transcritos de este organismo, surge de la necesidad de verificar las condiciones en que se estudió el perfil de expresión de *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar (punto 3, sección “Resultados y Discusión”). Conocer la existencia de otros genes homólogos permite determinar si las sondas diseñadas para las técnicas de hibridación y los cebadores diseñados para la cuantificación de la expresión mapean a una región de conservación alta o baja. Incluso, puede ayudar a predecir las proteínas que podrían ser reconocidas por el antisuero producido, en base a los pesos moleculares teóricos y las posibles modificaciones post-traduccionales.

De las estrategias aplicadas, la más exitosa fue la que utiliza cebadores degenerados para identificar nuevos transcritos. Se logró aislar de esta manera seis transcritos nuevos conteniendo el dominio SCP/TAPS. Probablemente parte del éxito de esta estrategia se deba a la utilización de un *pool* de ARN, representativo de todos los estadios del desarrollo estrobilar. De esta manera, se puede identificar una mayor cantidad de transcritos que analizando un estadio en particular. Resta aún determinar en que estadio se expresa cada transcripto identificado mediante retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para cada uno. Además es deseable rastrear una mayor cantidad de clones para intentar identificar nuevos transcritos.

La estrategia de RACE 3' fue parcialmente exitosa, lográndose completar uno de los dos transcritos incompletos. Como se mencionó anteriormente, es necesario verificar que éste realmente sea la continuación del transcripto *McCRISP4* publicado, debido a las diferencias en las secuencias (2.4% de diferencias). Para ello, deberían utilizarse cebadores ubicados hacia la región 5' conocida de modo que, el producto de amplificación tenga un porcentaje de cobertura mayor (no es lo mismo 4 diferencias en 60pb que 5 diferencias en 500pb, por ejemplo). En particular, podría utilizarse como cebador directo para la primera reacción de PCR el cebador PPA1, utilizado para la identificación inicial de estos transcritos (Britos, 2000). Se podría utilizar el cebador directo externo (*McCR4F*) diseñado en este trabajo para realizar la segunda reacción de PCR, que le daría especificidad (recordar que el cebador PPA1, si bien fue diseñado para amplificar específicamente el transcripto *McCRISP1*, sirvió para la amplificación de todos los transcritos conocidos de *M. corti*). Esta verificación está siendo realizada y resta obtener los resultados de secuenciación. De esta manera, se obtendría un producto de PCR de aproximadamente 600pb, que permitiría obtener una cobertura de 145pb con el transcripto publicado. Algo similar podría realizarse para *McCRISP1* intentando amplificar el extremo 3' de este transcripto, que en este trabajo no se pudo obtener. En ambos casos convendría utilizar como molde para la retrotranscripción un *pool* de ARNs de distintos estadios de desarrollo.

La estrategia de RACE 5' no fue exitosa para ninguno de los transcritos analizados, además de que no se logró amplificar un gen de expresión constitutiva (*TPM1*). Como se mencionó anteriormente, esta técnica implica diversas reacciones enzimáticas para la ligación del adaptador en el extremo 5' de los ARNm. Una alternativa para el aislamiento del extremo 5' de los ARNm de interés sería la realización de una PCR inversa. La importancia de aislar el extremo 5' de estos genes radica en que permite determinar si la proteína codificada presenta las características de un péptido señal de secreción.

Otra alternativa, que tendría que ser testada, es que estos transcritos tengan en su extremo 5' la secuencia *Spliced Leader*, la cual se encuentra asociada a una caperuza no convencional en el extremo 5', formado por trimetil-guanosina, como ocurre en el cestodo *E. multilocularis* (Brehm et al., 2000). Según lo reportado por Fernández et al., (2002) las librerías de ADNc de *E. granulosus* generadas mediante la misma estrategia que en este trabajo (5'-RACE) o a partir del mismo ARN pero utilizando un cebador para la secuencia *Spliced Leader* no se solapan. Los autores proponen que esto no se debería a un problema de la eliminación del CAP, sino a un problema durante la ligación del adaptador en el extremo 5'. Al menos un transcripto codificante para una proteína con dominio SCP/TAPS en *E. granulosus* sufre *trans-splicing*, ya que buscando estos genes en la base de datos del género *Echinococcus* (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus>), se encontró un transcripto que presenta homología a *McCRISP2* y se encuentra en la librería de ADNc de protoesclólices pepsinados de *E. granulosus* que poseen *Spliced Leader* (*E. granulosus spliced-leader cDNAs library from pepsin-treated protoscoleces, hit: EGPSPl-14h06.q1k bases 40 to 876 (SL to QR)*). La secuencia *Spliced Leader* de *M. corti* no ha sido descrita. Sin embargo, se conoce la secuencia de los cestodos *E. multilocularis* y *E. granulosus* que presentan un 97% de conservación entre sí. Las secuencias de trematodos presentan aproximadamente un 50% de conservación con las del género *Echinococcus* por lo que se cree que derivan de un gen ancestral común a los platelmintos (Brehm et al., 2000). Se podría intentar utilizar un cebador directo para el *Spliced Leader* de *E. granulosus* (disponible en nuestro laboratorio) y un cebador reverso degenerado contra un motivo conservado de la superfamilia SCP/TAPS (por ejemplo el motivo CRISP1 que es el más conservado, ver Figura 23 y discusión posterior). De esta manera, se podría intentar aislar transcritos que cumplan ambas características, dado que hay al menos uno en *E. granulosus* que lo cumple. Si esta estrategia no funcionara, se debería identificar la secuencia *Spliced Leader* de *M. corti*, por ejemplo realizando una inmunoprecipitación con un anticuerpo contra la caperuza modificada y secuenciando los ARNs que se recuperan. La secuencia del extremo 5' de todos los transcritos debería ser la misma (o similar en caso que existan varias secuencias diferentes de *Spliced Leader*).

En la Figura 23 se muestra el alineamiento de las secuencias traducidas identificadas en este trabajo junto a las secuencias proteicas obtenidas para cestodos en la base de datos del *Sanger Institute*.

Puede observarse que las secuencias de los transcritos aislados por la estrategia de cebadores degenerados son más divergentes que el conjunto de las demás secuencias proteicas de cestodos, incluidas *McCRISP2* y *McCRISP4*. De todas maneras, todas mantienen conservación a nivel de las características de los aminoácidos en los motivos consenso descritos para la superfamilia (Figura 23, marcado con líneas negras). Además, una inspección general permite observar dos regiones adicionales que presentan conservación, denominadas R2 (conservada en todas las secuencias analizadas) y R1 (conservadas en las secuencias diferentes a las aisladas). Nótese además la diferencia que presenta EmCRH, un posible pseudogen.

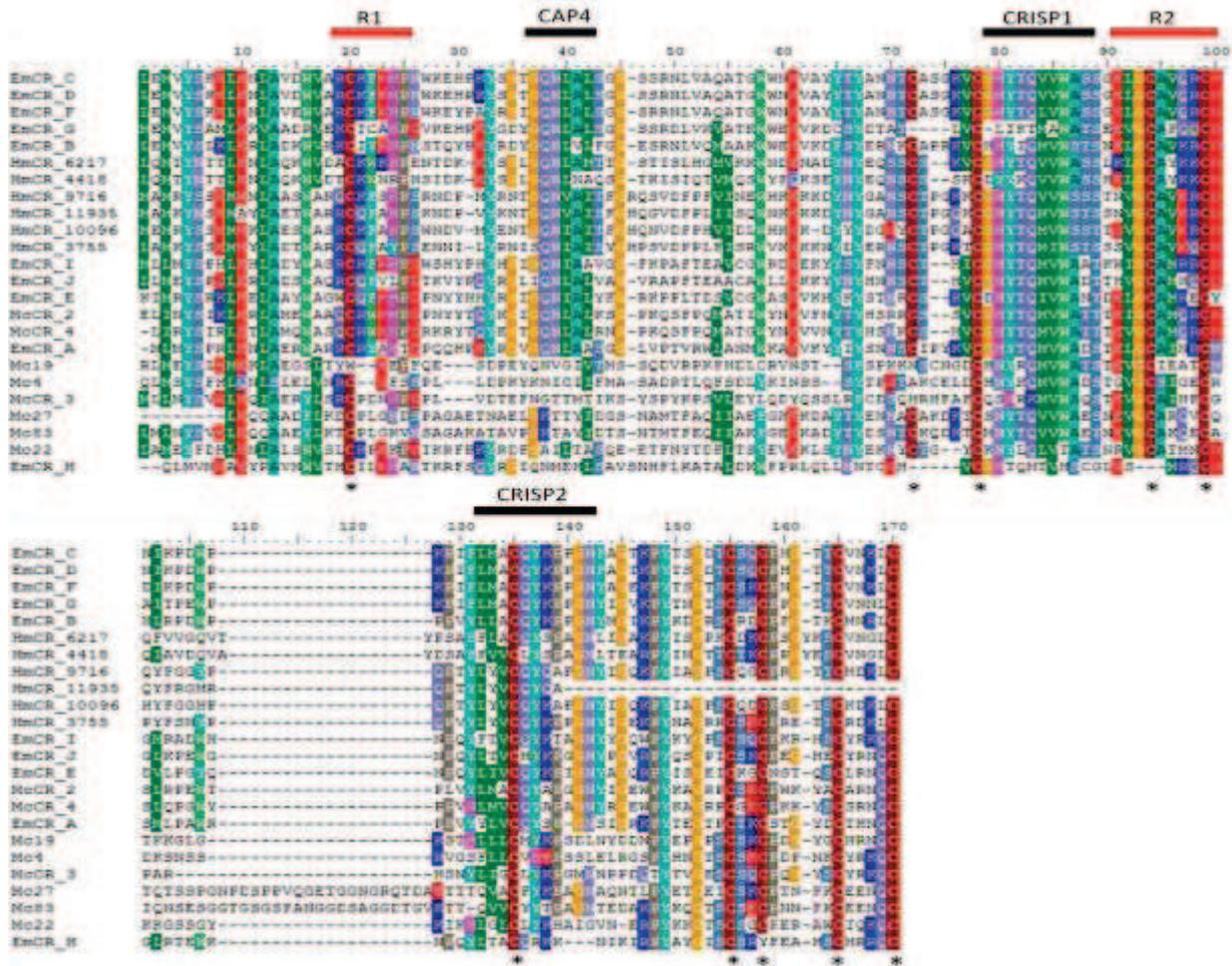


Figura 23: Alineamiento parcial a nivel proteico de miembros de la superfamilia SCP/TAPS de cestodos. Se realizó el alineamiento con el programa *ClustalX* con los parámetros por defecto. Se incluyeron los transcritos traducidos obtenidos en este trabajo mediante la estrategia de cebadores degenerados (denominadas Mc#), la secuencia traducida del transcripto *McCRISP4*, que consiste en la fusión de la región 3' aislada en este trabajo mediante 3' RACE fusionada a la secuencia publicada (*McCR4*) y las secuencias traducidas de los transcritos previamente publicados de *M. corti* (*McCR3* y *McCR2*). Además se incluyen las secuencias proteicas encontradas en la base de datos del *Sanger Institute* de los cestodos *E. multilocularis* y *H. microstoma*. Las secuencias analizadas incluyeron los aminoácidos inmediatamente posteriores al motivo PPA, en base al cual se diseñaron los cebadores degenerados, hasta la última cisteína conservada, eliminando las regiones C-terminales. Sobre el alineamiento, con líneas negras se señalan los motivos característicos de la superfamilia (CRISP1, CRISP2 y CAP4) y con líneas rojas dos regiones conservadas en las secuencias analizadas.

En la Figura 24 se muestra un análisis filogenético realizado para estas secuencias proteicas. Puede observarse que las secuencias analizadas se dividen en dos grupos en el 74% de los árboles. Un grupo que contiene las secuencias de cestodos encontradas en las bases de datos (*E. multilocularis* y *H. microstoma*) junto a *McCRISP2* y *McCRISP4* (Grupo 1, Figura 24). Las relaciones entre las proteínas pertenecientes a este grupo no están tan claras, como lo indican los valores de *bootstrap* en los nodos más externos. El segundo grupo contiene a todos los transcritos aislados por la estrategia de cebadores degenerados (Grupo 2, Figura 23) junto a *McCRISP3*. Estas son todas proteínas que en el análisis global contienen el dominio SCP/TAPS (Análisis en *Pfam*: <http://pfam.sanger.ac.uk/>) pero que sus secuencias se encuentran más

alejadas del consenso de los aminoácidos que conforman los motivos característicos. Al parecer, esta clase de proteínas está sobre-representada en *M. corti*. Tal vez, realizar una búsqueda más exhaustiva revele la presencia de estas proteínas más divergentes en los demás cestodos relacionados.

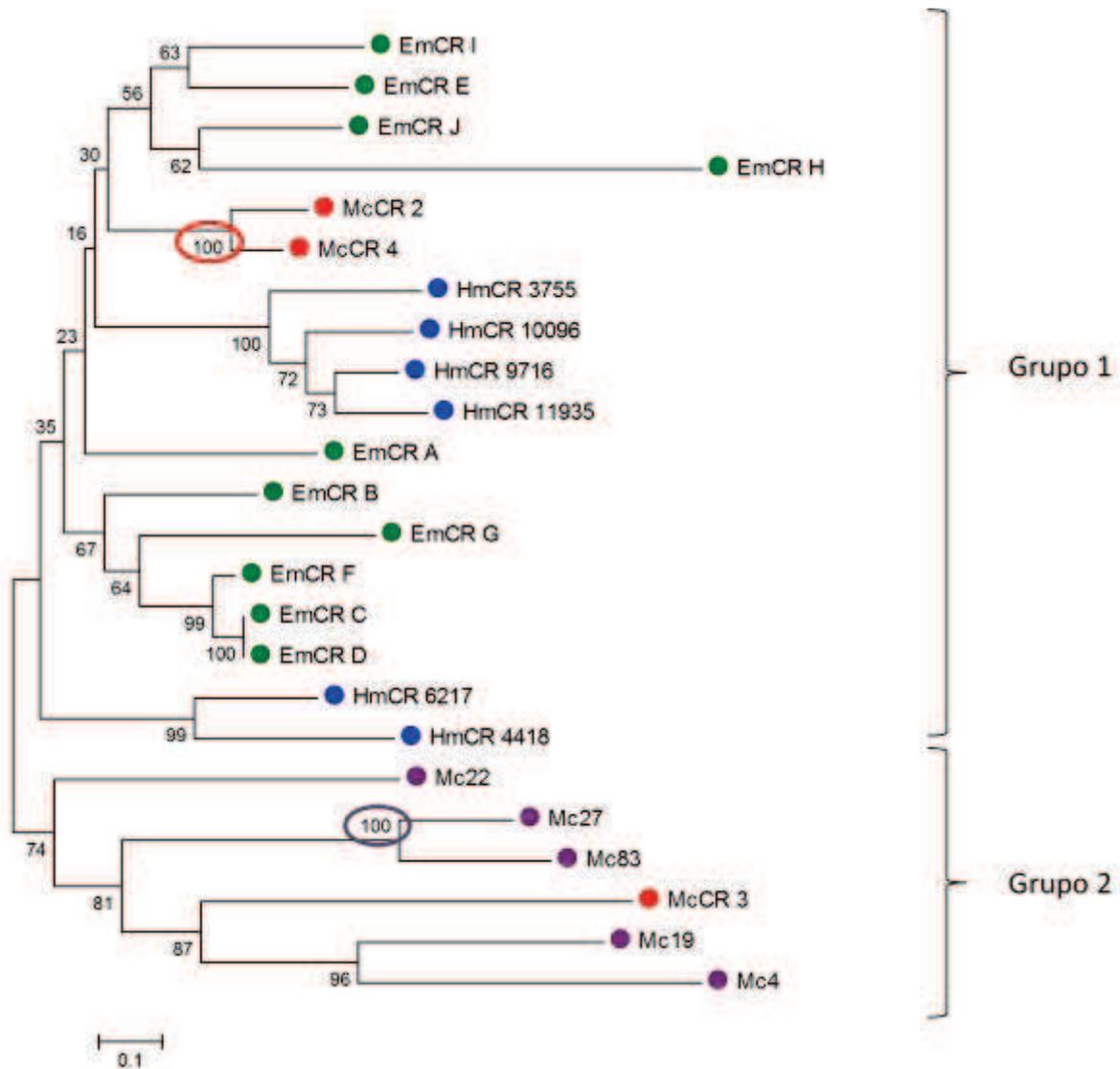


Figura 24: Relaciones filogenéticas de las secuencias proteicas con dominio SCP/TAPS aisladas en el presente trabajo y de cestodos relacionados. El conjunto de secuencias y el alineamiento es el mostrado en la figura anterior. El análisis filogenético se realizó utilizando el método *Neighbor-Joining* del paquete MEGA5, mostrándose el árbol óptimo. El largo de las ramas representa la distancia evolutiva calculada con el método de corrección de *Poisson* (número de sustituciones aminoacídicas por sitio). Se muestra en cada nodo el porcentaje de los árboles obtenidos en el test de *bootstrap* en los que las secuencias se encontraban agrupadas (1000 réplicas). Se utilizaron 24 secuencias aminoacídicas. Eliminando las posiciones conteniendo GAPS, se utilizaron 88 posiciones para el análisis. Se señalan en azul las secuencias de *H. microstoma*, en verde las de *E. multilocularis*, en rojo las secuencias previamente aisladas de *M. corti* (con extremo 3' conocido) y en violeta las nuevas secuencias aisladas en este trabajo. Se excluyó la secuencia Mc18 = Mc26 debido a su menor largo.

Algo que llama la atención son los pares de secuencias McCR4 / McCR2 y Mc27 / Mc83, que agrupan en el 100% de los árboles testeados (marcado con un círculo sobre el valor de confianza de cada nodo) indicando una alta homología entre las secuencias. En la Figura 25 se puede observar el alineamiento nucleotídico para McCRISP2 y McCRISP4.

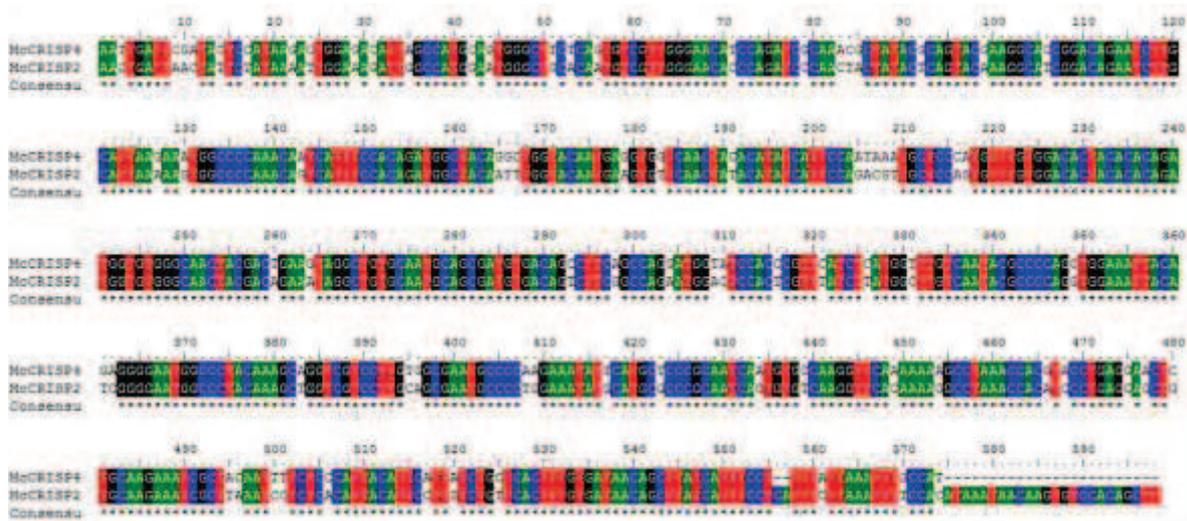


Figura 25: Alineamiento de *McCRISP2* y *McCRISP4*. Realizado con el programa *ClustalX* con los parámetros por defecto.

Se muestra en este alineamiento la alta conservación existente entre *McCRISP2* y *McCRISP4*. La secuencia *McCRISP4* utilizada fue construida fusionando *in silico* la secuencia conocida previamente (hasta la región donde hibrida el cebador directo utilizado en el RACE) con la nueva secuencia obtenida. Como se mencionó, la secuencia identificada en este trabajo como la región 3' de *McCRISP4* presentaba algunas diferencias con respecto a la secuencia previamente publicada y no existe certeza de que sean el mismo transcrito. Esto podría indicar la presencia de tres transcritos altamente similares. Existen diferentes escenarios para explicar esto. En primer lugar, se planteó que las diferencias entre las secuencias del transcrito *McCRISP4* puedan deberse a polimorfismos entre las tandas de organismos. *McCRISP2*, se re-aisló recientemente a partir de ADNc y la secuencia obtenida para este transcrito es igual a la secuencia publicada. Por lo tanto, la similitud entre *McCRISP2* y *McCRISP4* no puede deberse a que sean distintos alelos del mismo gen. La explicación más plausible sería la duplicación reciente de estos genes.

## **2. Estrategias para la producción de la proteína McCRISP2 soluble en forma recombinante**

En trabajos anteriores (Costábile, 2009), se intentó producir la proteína McCRISP2 recombinante en un sistema de expresión procariota, utilizando el vector pET22b+ (Novagen) y la cepa de *E. coli* BL21 *Star* (*Invitrogen*). Se obtuvo la proteína como cuerpos de inclusión, los cuales se solubilizaron con urea permitiendo la purificación de la proteína en condiciones desnaturizantes. Con este antígeno se produjo un antisuero en conejo contra la proteína recombinante McCRISP2 (Polo Tecnológico de Pando, Uruguay).

En este trabajo, se siguieron varias estrategias para la obtención de proteína recombinante soluble. En una primera instancia se intentó solubilizar la proteína producida en *E. coli* como cuerpos de inclusión mediante plegamiento en columna (Holzinger et al., 1996; Li et al., 2004; Wang et al., 2005). A continuación se ensayó la expresión en distintas cepas de *E. coli*, en particular en la cepa *SHuffle*, la cual está diseñada para la expresión de proteínas que presentan enlaces disulfuro. En paralelo, se intentó producir la proteína recombinante en el sistema de expresión eucariota *P. pastoris*, ya que es posible que la proteína McCRISP2 nativa presente modificaciones post-traduccionales y su ausencia podría afectar la solubilidad de la proteína al producirla en un sistema de expresión procariota.

### **2.1. Expresión en *Escherichia coli***

#### **2.1.1. Plegamiento en columna**

La proteína fusionada a una cola de histidinas en el extremo C-terminal (vector pET22b(+)) fue expresada en la cepa BL21 *Star* de *E. coli* como cuerpos de inclusión. Para realizar el plegamiento en columna se procuró en primer lugar obtener los cuerpos de inclusión sin trazas de proteínas solubles. Para ello se siguió el protocolo descrito en el punto 4.1.4 de la Sección “Materiales y Métodos”. Esta parte del trabajo se realizó con la colaboración del Lic. Leonardo Pelliza bajo la orientación de la Dra. Cecilia Fernández (Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR). Este grupo cuenta con experiencia en el plegamiento de proteínas insolubles conteniendo puentes disulfuro (Pellizza, 2010).

Una vez obtenidos los cuerpos de inclusión solubilizados en urea, se mezclaron con la resina conjugada a níquel Ni-NTA (QIAGEN). Se realizó un gradiente disminuyendo la concentración de urea y aumentando la concentración del par glutatión oxidado/glutatión reducido para eliminar progresivamente el agente desnaturizante y generar condiciones oxidantes para la generación de los enlaces disulfuro correctos. Luego de realizado el gradiente se ensayaron diferentes condiciones de elución.

En un primer ensayo se intentó la elución secuencial con *buffer* de elución base (*Buffer* de Elución #1 – Apéndice 1) en primer lugar, con el mismo *buffer* conteniendo una pequeña concentración de detergente (*Buffer* de Elución #2 – Apéndice 1) y finalmente con el *buffer* de elución base conteniendo urea 8M (*Buffer* de Elución #3 – Apéndice 1).

En la Figura 26 (carriles 2 a 10) se observa que las proteínas que eluyeron con los dos primeros *buffers* (condiciones no desnaturizantes) son contaminantes de mayor y menor peso molecular (flechas azules). Finalmente, cuando se eluyó con un *buffer* desnaturizante conteniendo urea 8M, se observó la proteína de interés (carriles 11 a 14, flecha blanca). Una

posible explicación para esto es que la proteína no se haya replegado correctamente al realizar el gradiente de urea y la misma precipitó y quedó retenida en la columna. Únicamente cuando se volvió a condiciones desnaturalizantes se logró desprenderla de la matriz. Esto pudo deberse a que la concentración de proteína cargada en la columna fue muy alta, lo que permite que las proteínas unidas a sitios adyacentes en la columna interactúen entre sí, favoreciéndose la formación de agregados proteicos dentro de la misma.

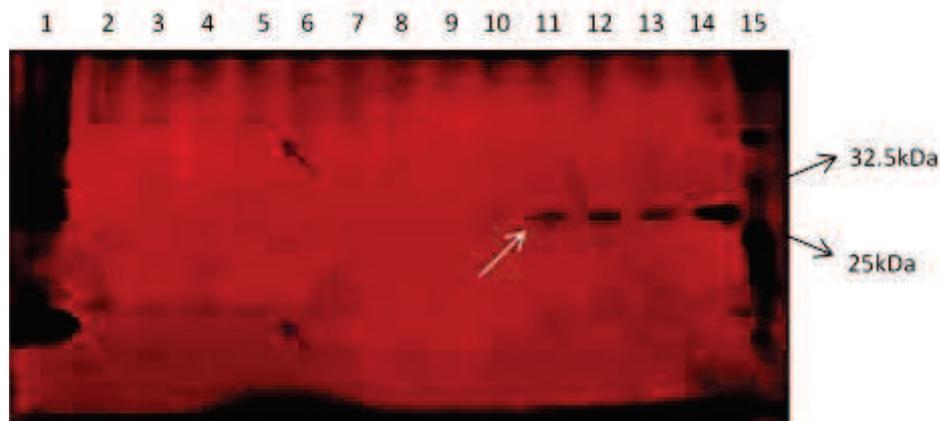


Figura 26: **Plegamiento en columna de McCRISP2.** SDS-PAGE al 15% en *Buffer* Tris – Glicina, teñido con nitrato de plata **1:** Percolado, **2 a 7:** Eluciones con *Buffer* #1, **8 a 10:** Eluciones con *Buffer* #2, **11 a 14:** Eluciones con un *Buffer* #3, **15:** Marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6–175 kDa), New England Biolabs #P7708S*). Las flechas azules indican contaminantes y la flecha blanca la proteína McCRISP2 eluida. A la derecha del gel se muestra el tamaño de las bandas de interés del marcador.

Se decidió realizar un nuevo experimento, en este caso cargando la columna con menor cantidad de proteína y realizando la elución con un *buffer* conteniendo pequeñas cantidades de agente desnaturalizante (*Buffer* de Elución # 4, Apéndice 1). Los resultados se muestran en la Figura 27.



Figura 27: **Plegamiento en columna de McCRISP2.** SDS-PAGE al 15% en *Buffer* Tris – Glicina, teñido con nitrato de plata **1:** Cuerpos de inclusión solubilizados en *buffer* conteniendo urea 8M cargados en la columna, **2:** Percolado, **3 a 12:** Eluciones de 1ml con *buffer* de Elución #4, **13:** Marcador de peso molecular (*New England Biolabs, Prestained Protein Marker, Broad Range (6–175 kDa) #P7708S*). La flecha negra indica la proteína eluida en la fracción número 3. La flecha azul indica una proteína contaminante de alto peso molecular. La punta de flecha indica la banda correspondiente a la lisozima utilizada para la purificación de los cuerpos de inclusión. A la derecha del marcador de peso molecular se muestran los tamaños de las bandas de interés.

En este caso se logró eluir la proteína McCRISP2 en la fracción de elución #3 (Figura 27, carril 5, flecha negra). Se observa también la presencia de una banda de mayor peso molecular que co-purifica con McCRISP2, por lo que la proteína no es totalmente pura. Esta banda puede ser la banda de alto peso molecular obtenida para las eluciones en *buffer* de elución #1 (Figura 26, carriles 2 a 5, flecha azul superior). Para confirmarlo se podría haber realizado un lavado con ese *buffer* y a continuación la elución en el *buffer* conteniendo urea 1M, esperando de esta manera que esa contaminación desaparezca.

Se debería haber intentado la elución con otros *buffers* y ensayar el plegamiento con la adición de osmolitos como arginina o glicerol entre otros (Arakawa y Tsumoto, 2003; Cabrita y Bottomley, 2004; Tsumoto et al., 2003). Al momento de proseguir con los experimentos, los ensayos de expresión de la proteína en *E. coli* comenzaron a dar resultados negativos, por lo que se tuvo que analizar la causa y resolverla.

Esta estrategia parece ser exitosa en cuanto a la obtención de proteína en condiciones menos desnaturizantes (urea 1M) que las iniciales, pero el rendimiento es bajo ya que no se observan las bandas eluidas en un SDS-PAGE teñido con *Coomassie* (sensibilidad 0.5µg de proteína). Por este motivo se comenzaron a ensayar otras alternativas para producir proteína soluble.

### 2.1.2. Expresión en diversas cepas de *Escherichia coli*

Con el objetivo de analizar el efecto de la cepa de expresión en la solubilidad de la proteína, se transformó con el plásmido *pET22b-McCRISP2* las cepas de *E. coli*: BL21 *CodonPlus-RIL*, BL21 *pLys* y *SHuffle*. Estas cepas presentan distintas características que pueden favorecer la expresión de la proteína recombinante en forma soluble.

**BL21 CodonPlus** es un derivado de la cepa BL21, que posee un plásmido conteniendo las secuencias necesarias para producir copias adicionales de ARNt poco frecuentes en bacterias y que se presentan con más frecuencia en eucariotas. En este caso son los ARNt que portan Arginina, Isoleucina y Leucina. Estos aminoácidos aparecen con frecuencia en la proteína McCRISP2. Es posible que la generación de pausas durante la expresión en *E. coli* produzca un problema en el plegamiento de la proteína al no disponer de la cantidad suficiente de ARNt cargados o producir un bajo rendimiento. Se ha reportado la expresión en esta cepa de una proteína del nematodo *Teladorsagia circumcincta* perteneciente a la superfamilia SCP/TAPS en forma soluble (Nisbet et al., 2013).

La cepa **BL21 pLys** se eligió debido a que es un derivado de la cepa BL21 que posee un plásmido conteniendo la secuencia codificante de la lisozima. Esta cepa se utiliza para la expresión de proteínas potencialmente tóxicas ya que reprime a la ARN polimerasa del fago T7 hasta el momento de la inducción con IPTG, inhibiendo la expresión basal. Además, la lisozima colabora con la lisis celular ya que hidroliza los peptidoglicanos de la pared bacteriana. En ensayos previos, la lisis celular no se logró con eficiencia, ya que se observa un perfil muy similar en las fracciones solubles e insolubles, lo cual no es lo esperado. Para lisar completamente las células es necesario utilizar muchos pulsos de sonicación, lo que genera desnaturización de las proteínas, contribuyendo a la insolubilidad de la proteína recombinante.

La cepa **SHuffle** está específicamente diseñada para la expresión en el citoplasma de proteínas que forman enlaces disulfuro. Esta cepa tiene mutados los genes *gor* (glutación reductasa) y *trxB* (tioredoxina reductasa) lo que genera un ambiente oxidante en el citoplasma (los grupos sulfhidrilo de encuentran oxidados, lo que es compatible con la formación de enlaces disulfuro

por parte de DsbA). Además, esta cepa sobre-expresa la isomerasa de puentes disulfuro DsbC que repara los enlaces disulfuro generados incorrectamente por DsbA (Lobstein et al., 2012). Se espera que en esta cepa no se formen agregados proteicos debido a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares no deseados.

En la Figura 28 se muestran los resultados de la expresión en estas tres cepas junto a la expresión en la cepa BL21 *Star*, utilizada de rutina en nuestros estudios.

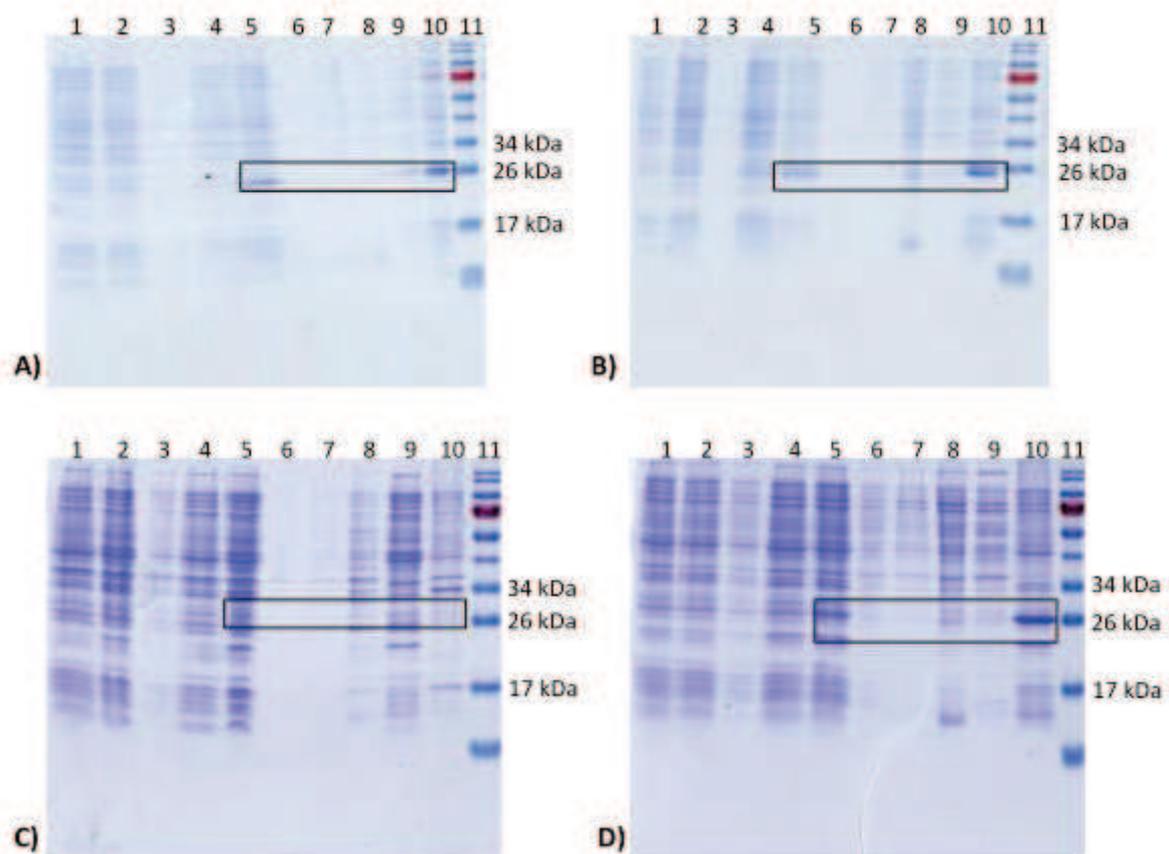


Figura 28: **Expresión de McCRISP2 en diferentes cepas de *E. coli*.** SDS-PAGE al 15% en *Buffer Tris – Glicina*, teñido con *Coomassie Blue*. **A)** BL21 *Star*, **B)** BL21 *pLys*, **C)** BL21 *CodonPlus* y **D)** *SHuffle*. En todos los casos: **1 a 3:** Control negativo, expresión del vector sin inserto: **1:** FT no inducida, **2:** FT inducida 3hs, **3:** FM inducida 3hs precipitada con TCA. **4 a 10:** Expresión de la proteína recombinante, **4:** FT no inducida, **5:** FT inducida 3hs, **6:** FM inducida 3hs precipitada con TCA, **7:** FP inducida 3hs, **8:** FP inducida 3hs precipitada con TCA, **9:** FS inducida 3hs y **10:** FI inducida 3hs. **11:** Marcador de peso molecular (*Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671*). FT: Fracción Total, FM: Fracción Medio, FP: Fracción Periplasma, FS: Fracción Soluble y FI: Fracción Insoluble. TCA: ácido tricloroacético. El recuadro negro marca la región donde se espera encontrar la proteína recombinante en las diferentes fracciones. A la derecha de cada gel se muestra el tamaño de las bandas de interés del marcador.

En este análisis se observa que en todas las cepas ensayadas en que se produce la proteína, lo hace en forma insoluble. Todas las células fueron procesadas en paralelo, y se pueden observar diferencias en la eficiencia de la lisis. Las cepas BL21 *Star* y BL21 *pLys* (Figura 28, paneles A y B, respectivamente) parecen ser las más difíciles de lisar ya que el perfil de proteínas en la fracción

soluble (donde se observa además menor cantidad de proteínas) y la fracción insoluble es similar. La única diferencia es la presencia de la proteína recombinante (señalada con un recuadro). La cepa BL21 *CodonPlus* (Figura 28, panel C) presenta un perfil diferenciado, sin embargo no se observa la presencia de proteína recombinante. Por otro lado, la cepa que presentó un mayor nivel de expresión fue *SHuffle*, aunque la proteína recombinante se observa en la fracción insoluble (Figura 28, panel D, carril 10). Los perfiles de las fracciones medio y periplasma en casi todos los casos son iguales a la fracción soluble. Esto quizás pueda deberse a que el protocolo no es adecuado y además de liberar el periplasma se liberan proteínas citosólicas.

Para analizar si alguna pequeña fracción de proteína se expresa en forma soluble, ya sea en el medio, el periplasma o el citoplasma celular, se realizó un *Western blot* con un anticuerpo monoclonal que reconoce la cola de histidinas (fusionada a McCRISP2). En la Figura 29 se muestra el resultado, donde se observa la presencia de la proteína únicamente en la fracción insoluble (carril 7, panel A y carril 5, panel B). Se observa también en la fracción total de ambas cepas, como es de esperar (carril 3, panel A y carril 2, panel B).

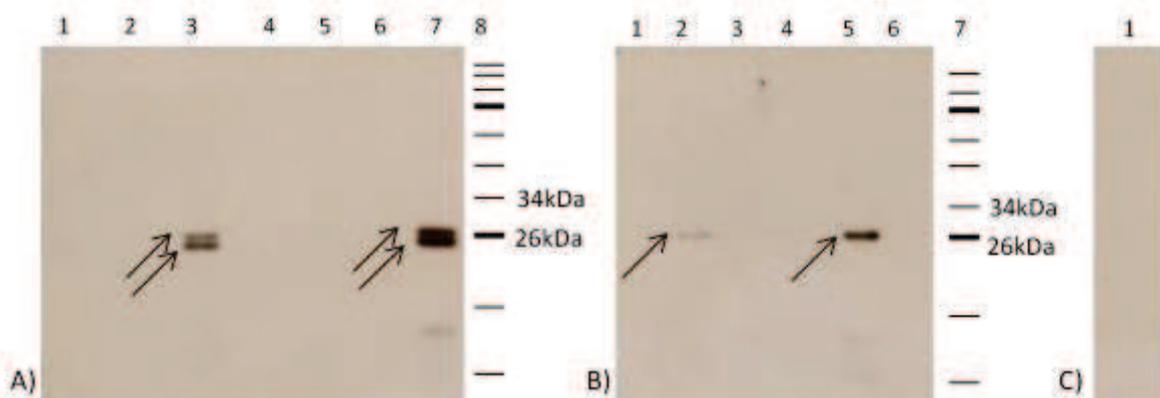


Figura 29: **Western blot sobre las distintas fracciones de la expresión en distintas cepas de *E. coli*.** Incubación con anticuerpo anti poli-histidina (*Sigma – Aldrich*, dilución 1/5000) (A y B) o sin anticuerpo (C) seguido de incubación anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (*DAKO*, dilución 1/5000) y revelado con reactivo quimioluminiscente. A) **Cepa BL21 *pLys***. **1:** FT *pET* sin inserto inducido 3hs, **2:** FT *pET-McCRISP2* No inducida, **3:** FT *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **4:** FM *pET-McCRISP2* inducida 3hs precipitada con TCA, **5:** FP *pET-McCRISP2* inducida 3hs precipitada con TCA, **6:** FS *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **7:** FI *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **8:** Marcador de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671, Fermentas*). B) **Cepa *SHuffle***. **1:** FT *pET-McCRISP2* No inducida, **2:** FT *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **3:** FP *pET-McCRISP2* inducida 3hs precipitada con TCA, **4:** FS *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **5:** FI *pET-McCRISP2* inducida 3hs, **6:** FT *pET* sin inserto inducido 3 horas, **7:** Marcador de peso molecular (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM0671, Fermentas*). C) **Control negativo** sin anticuerpo primario. **1:** FT *pET-McCRISP2* inducida 3hs, cepa *SHuffle*. FT: Fracción Total, FM: Fracción Medio, FP: Fracción Periplasma, FS: Fracción Soluble y FI: Fracción Insoluble. TCA: ácido tricloroacético. Las fechas indican las bandas reconocidas por el anticuerpo. A la derecha del gel se muestran los tamaños de las bandas de interés del marcador.

En la cepa BL21 *pLys* se observa dos bandas (Figura 29, Panel A) de tamaños muy similares, no así en la cepa *SHuffle* (Figura 29, Panel B). La región codificante se encuentra fusionada al péptido procariota de secreción al periplasma *pelB*. Puede ser que en la cepa BL21 *pLys* parte de la proteína producida se exporte al periplasma, con el correspondiente corte del péptido señal. Esto produciría dos poblaciones de proteínas: una porción citosólica conteniendo el péptido

señal (de mayor tamaño) y otra periplásmica carente de este péptido (de menor tamaño). Lo que no concuerda con esta hipótesis es que no se observa la banda de menor tamaño en la fracción periplásmica, posiblemente debido a que el método utilizado para obtener esta fracción no sea óptimo. Se ensayaron dos métodos de extracción de periplasma, pero en ninguno se obtuvo proteína recombinante en esta fracción (no se muestra). Además, ambas bandas se observan en la fracción insoluble. Puede ocurrir que durante la lisis celular una alta proporción de proteínas se desnaturalicen por acción del calor generado por el método, observándose que la fracción insoluble presenta mayor cantidad de proteínas de lo esperado (ver Figura 28). Dentro de estas proteínas no esperadas, se encontraría la proteína McCRISP2 originalmente exportada al periplasma que se desnaturalizó junto a otras proteínas normalmente solubles. Para verificar esta hipótesis deberían testearse otros métodos de lisis celular menos drásticos.

### 2.1.3. Expresión como proteína de fusión a GST

Otra manera de obtener una proteína en forma soluble en *E. coli* es fusionándola a la proteína GST (Glutación – S – Transferasa) (Esposito y Chatterjee, 2006)

Para ello se clonó la región codificante para McCRISP2 en el vector *pET41a*, entre los sitios *SpeI* y *XhoI*. Al clonar de esta forma se elimina el sitio incluido en el vector para el clivado de GST en caso de ser necesario. Es por esta razón que este sitio fue incluido en el cebador directo (Tabla 13, Apéndice 2).

Las construcciones fueron secuenciadas verificando que todos los elementos del vector estuvieran en fase con la proteína de interés. De esta manera se obtuvo la proteína McCRISP2 fusionada a GST en el extremo N-terminal y a una cola de 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal.

La expresión de proteínas de fusión a GST se realizó junto a la Lic. Soledad Echeverría. Para ello, se transformó con este vector la cepa *SHuffle* de *E. coli* y se realizó un ensayo de expresión en medio LB a 30°C. Se tomaron alícuotas de expresión cada una hora luego de la inducción para determinar la solubilidad. En la Figura 30 se muestra el resultado de este ensayo.

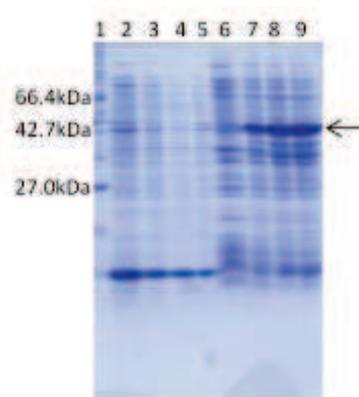


Figura 30: **Expresión de McCRISP2 fusionada a GST en *E. coli***. SDS PAGE al 15% en *buffer* Tris – Glicina y tinción con Coomassie Blue. **1:** Marcador de peso molecular (*Protein Marker, Broad Range (Premixed Format), New England Biolabs, #P7702S*), **2:** FS No inducida, **3:** FS Inducida 1h, **4:** FS inducida 2hs, **5:** FS inducida 3hs, **6:** FI No inducida, **7:** FI Inducida 1h, **8:** FI inducida 2hs, **9:** FI inducida 3hs. La flecha muestra la banda correspondiente a la proteína de interés en la fracción insoluble. A la izquierda del marcador se indican los tamaños de las bandas de interés

Se puede observar que incluso con la fusión a la proteína GST la proteína se sigue expresando de manera insoluble. En este ensayo se realizó la inducción a 30°C, lo cual es ventajoso para proteínas que presentan problemas de insolubilidad. Además se observa una menor cantidad de proteínas en la fracción soluble que en la insoluble, lo que puede indicar nuevamente problemas en el protocolo de lisis de las bacterias.

Con McCRISP2 no se realizaron más ensayos, sin embargo, sí se realizaron ensayos por parte de la Lic. Soledad Echeverría con dos proteínas homólogas de *E. granulosus* en el marco de otro proyecto. Para estas proteínas se realizó el mismo procedimiento de plegamiento en columna a partir de los cuerpos de inclusión seguido para McCRISP2, eluyéndola en un *buffer* con 0.5M de urea. Para evitar el proceso de plegamiento en columna y determinar si es posible solubilizar la proteína en una concentración menor de urea, se intentó sin éxito la disolución de los cuerpos de inclusión en un *buffer* conteniendo urea 2M.

## 2.2. Expresión en *Pichia pastoris*

Debido a que McCRISP2 es una proteína que presenta sitios consenso para la introducción de modificaciones post-traduccionales y diez residuos de cisteína, que mediante un análisis bioinformático se determinó que podrían formar cinco enlaces disulfuro, se decidió ensayar la expresión recombinante en un hospedero eucariota. *P. pastoris* es un sistema eucariota utilizado exitosamente para producir diversas proteínas recombinantes (Cereghino y Cregg, 2000). En particular se ha utilizado para producir proteínas pertenecientes a la superfamilia SCP/TAPS, como por ejemplo las proteínas Na-ASP2 (Goud et al., 2005); Na-ASP1 (Inan et al., 2006), Ay-ASP1 y Ay-ASP2 (Goud et al., 2004) de nematodos, Ag5 de la avispa *Polybia scutellaris* (Vinzón et al., 2010), entre otras.

*P. pastoris* presenta una combinación de las ventajas de los sistemas de expresión procariontes (fácil manipulación, crecimiento rápido, y bajo costo) con las de los sistemas de expresión eucariotes (secreción eficiente de proteínas, correcto plegamiento e introducción de modificaciones post-traduccionales) (Yin et al., 2007).

En este trabajo se utilizó el *kit EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen)* disponible en nuestro laboratorio, siguiendo los lineamientos generales sugeridos por el fabricante.

### 2.2.1. Selección del sistema de expresión y clonado en el vector *pPICZαA*

En primer lugar, se clonó la región codificante de McCRISP2 en el vector *pPICZαA*, que permite la expresión de la proteína de interés fusionada a un péptido señal de secreción ( $\alpha$ -factor de *Saccharomyces cerevisiae*). Se eligió de esta manera expresar la proteína recombinante secretada al medio de cultivo, dadas las características de McCRISP2, la cual tiene las características de proteínas secretadas y contiene sitios probables de glicosilación.

Éste es un vector que puede utilizarse tanto en procariontes, como en eucariotes. De esta manera permite seleccionar y propagar la construcción correcta en *E. coli* para producir la cantidad de ADN suficiente para la transformación de levaduras.

Para el clonado en el vector de expresión se realizó una reacción de PCR utilizando como molde un plásmido conteniendo la región codificante de McCRISP2. Los cebadores utilizados presentan sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *Sall*, para el clonado direccional en *pPICZαA*. Para asegurar la correcta digestión del inserto, el mismo se clonó en el vector T *pJET 1.1 (Fermentas)*.

Si bien este vector presenta sitios de corte para las enzimas de restricción elegidas, estos se encuentran por fuera del sitio de clonado múltiple y los productos de digestión total y parcial son distinguibles en un gel de agarosa.

De esta manera, se clonó el producto de PCR purificado (Figura 31, panel A) en el vector T, el cual se digirió con las enzimas de restricción elegidas en una digestión doble. Se eligió la preparación *pJET – McCRISP2* #6 (Figura 31, panel B, carril 4) para continuar con el clonado en el vector de expresión.

En paralelo se propagó y digirió el vector de expresión sin inserto (no se muestra). Los productos de ambas digestiones se purificaron desde un gel de agarosa (Figura 31, C) y se ligaron entre sí. Una vez transformados en la cepa *XL1* de *E. coli*, los plásmidos recombinantes se digirieron con ambas enzimas para verificar la presencia de inserto (Figura 31, D). Se envió a secuenciar la preparación #1, verificando que la región codificante (sin el péptido señal predicho) se encuentra fusionada y en fase con el péptido de secreción del vector en el extremo N-terminal y la cola de histidinas en el extremo C-terminal.

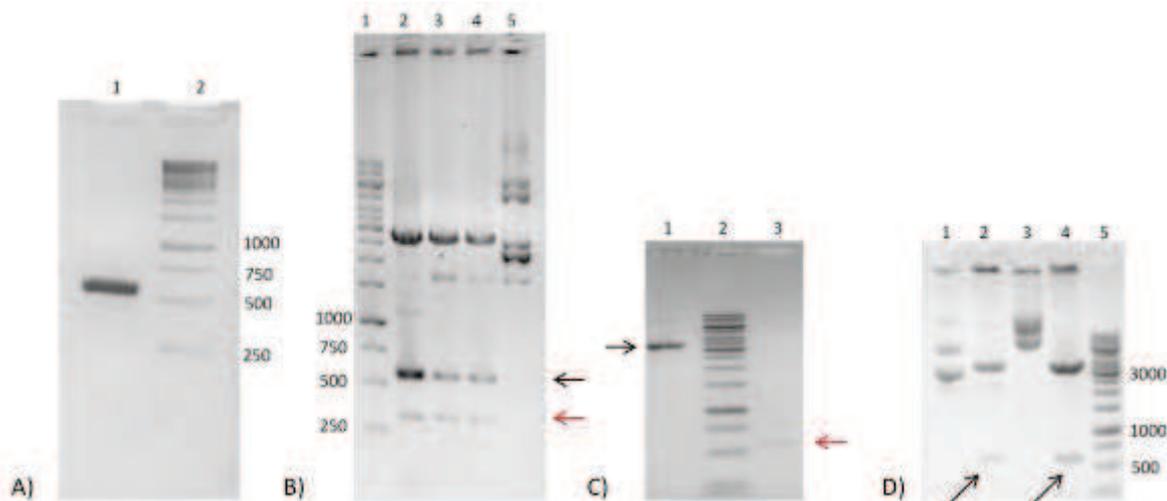


Figura 31: **Clonado en el vector de expresión *pPICZaA***. A) **Reacción de PCR para clonar la región codificante *McCRISP2*** (banda purificada). Electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE 1X y visualización mediante tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. **1:** 5 $\mu$ l de producto de PCR purificado. **2:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas*). B) **Digestiones de vectores T recombinantes**. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X y visualización mediante tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. Preparaciones del vector *pJET1.1*. **1:** Marcador de Peso Molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas*), **2:** Preparación #3 digerida, **3:** Preparación #4 digerida, **4:** Preparación #6 digerida, **5:** Preparación #6 sin digerir. En todos los casos se sembraron 10 $\mu$ l de las digestiones y 2 $\mu$ l de plásmido sin digerir. La flecha negra muestra el fragmento de interés y la flecha roja un segmento de menor tamaño esperado para el vector *pJET1.1* digerido con las enzimas de restricción elegidas. C) **Productos de digestión para el clonado direccional en *pPICZaA*** (bandas purificadas). **1:** 3 $\mu$ l de *pPICZaA* digerido con *EcoRI* y *Sall*, **2:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas*), **3:** 3 $\mu$ l de *McCRISP2* digerido con *EcoRI* y *Sall*. La flecha negra muestra el producto del plásmido digerido y la roja el inserto digerido. D) **Digestiones de plásmidos recombinantes *pPICZaA – McCRISP2* para verificación de incorporación del inserto**. **1:** 1.5 $\mu$ l preparación #1 sin digerir, **2:** 10 $\mu$ l preparación #1 digerida, **3:** 1.5 $\mu$ l preparación #2 sin digerir, **4:** 10 $\mu$ l preparación #2 digerida, **5:** Marcador de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, Fermentas*). Las flechas indican el inserto escindido del vector (levemente mayor a 500pb)

A continuación se digirió el plásmido con la enzima *SacI* para linealizarlo en la región del promotor (región 5'AOX1). De esta manera se facilita la recombinación de la región de ADN de interés en el genoma de la levadura, mediante un entrecruzamiento simple. Este procedimiento se realizó cada vez que se transformaron levaduras. En todos los casos se procuró obtener 10µg de ADN linealizado puro.

### 2.2.2. Transformación en *P. pastoris*

Para la transformación se utilizaron las cepas X33 (salvaje, fenotipo Mut<sup>+</sup> para la utilización de metanol), GS115 (auxotrófica para Histidina, fenotipo Mut<sup>+</sup> para la utilización de metanol) y KM71H (fenotipo Mut<sup>S</sup> para la utilización de metanol al tener interrumpido el gen *aox1* con el gen *ARG4*). Estas cepas vienen incluidas en el *kit* utilizado.

Inicialmente se intentó la transformación de las levaduras mediante un método químico (*EasyComp*<sup>TM</sup>). Tras dos intentos en los que se obtuvieron pocas colonias, se decidió transformar por el método de electroporación. En este caso se obtuvieron varias colonias, las cuales fueron testeadas para analizar la presencia de inserto por diferentes métodos (ver Punto 2.2.3). En la Tabla 8 se resumen las transformaciones realizadas y el resultado obtenido para cada una.

Tabla 8: Resumen de transformaciones realizadas

N°	Cepas	Método	Resultado
1	KM71H y X33	<i>EasyComp</i> <sup>TM</sup>	Se obtuvieron pocas colonias. No se logró verificar la integración en el genoma
2	X33	<i>EasyComp</i> <sup>TM</sup>	Contaminación
3	GS115	Electroporación	Obtención de 36 colonias de distintas placas. Se logró verificar la integración al genoma
4	KM71H y GS115	Electroporación	Obtención de 52 colonias de distintas placas. Se logró verificar la integración al genoma

En cada ensayo se realizó la transformación con el vector *pPICZαA* sin inserto digerido para utilizarlo como control negativo de la expresión. No se logró verificar la integración en el genoma de ninguna colonia de esta transformación.

### 2.2.3. Verificación de integración en el genoma de la levadura hospedera.

Una vez obtenidas las colonias de la transformación, las mismas se numeraron y ordenaron para permitir su correcta identificación. A partir de estas colonias se intentaron varias técnicas para la identificación de clones recombinantes. En primer lugar, se intentó optimizar el PCR a partir de colonias. En vistas de los resultados negativos obtenidos se ensayaron las estrategias de extracción de ADN genómico y posterior PCR y la de inmunoblot de colonias.

### 2.2.3.1. PCR a partir de colonias

Se comenzó analizando la integración al genoma mediante PCR a partir de las colonias obtenidas en la transformación. Para ninguno de los clones analizados se obtuvo un resultado satisfactorio. A continuación se describen las variaciones realizadas a esta técnica.

En una primera instancia se intentó lisar las levaduras mediante resuspensión en agua e incubación a 90°C. A partir de esa mezcla de lisis se utilizaron diferentes volúmenes como molde para la reacción de PCR. Las condiciones de reacción y el programa de ciclado fueron los sugeridos en el manual del *kit* y se mantuvieron incambiados en todos los ensayos.

En una segunda instancia se intentó la lisis mediante incubación con liticasa (sugerido por el manual). El procedimiento posterior fue el mismo que para la lisis por incubación a 90°C.

En una tercera y última instancia se lisaron las levaduras con liticasa y se probaron dos tratamientos adicionales intentado disminuir la cantidad de posibles inhibidores de la reacción de PCR: tratamiento con RNasa y centrifugación para clarificar la mezcla de restos celulares. De estos tratamientos se ensayaron diferentes diluciones de las muestras.

### 2.2.3.2. PCR sobre ADN genómico

Una segunda estrategia para analizar la integración en el genoma fue extraer el ADN genómico y utilizarlo como molde en reacciones de PCR. Esta estrategia fue la más exitosa, ya que se obtuvieron productos de PCR del tamaño deseado (Figura 32).

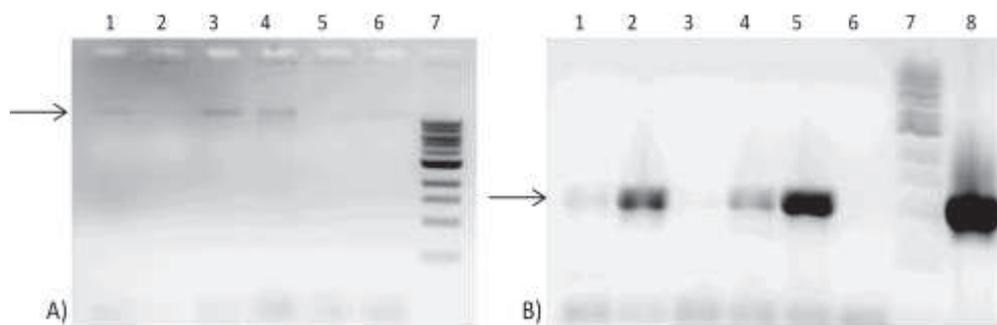


Figura 32: **Extracción de ADN genómico y PCR.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X visualizado mediante tinción con Bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. A) **ADN genómico extraído de colonias aisladas obtenidas en la transformación** (5 $\mu$ l de cada preparación). 1: T31, 2: T32, 3: T36, 4: T37, 5: T38, 6: T39, 7: Marcador de peso molecular (*1Kb DNA Ladder, New England Biolabs*). Se muestra con una flecha la banda de alto peso molecular obtenida para las distintas colonias B) **PCR utilizando ADN genómico como molde utilizando los cebadores AOX1 3' y AOX1 5'** (15 $\mu$ l de cada reacción). 1: T31, 2: T32, 3: T36, 4: T37, 5: T38, 6: T39, 7: Marcador de peso molecular (*1Kb DNA Ladder, New England Biolabs*), 8: Control positivo (plásmido *pPICZ $\alpha$ A - McCRISP2*). Se muestra con una flecha las bandas obtenidas en la reacción de PCR

En esta figura se observa la diferencia de intensidad de los productos de PCR que se correlaciona inversamente con la intensidad de la banda de ADN genómico. Las bandas de ADN genómico más tenues (carriles 2 y 5, panel A) producen las bandas más intensas en la PCR

(carriles 2 y 5, panel B) y viceversa. Con este resultado, se intentó la expresión de la colonia T38 (carril 5), T32 (carril 2) y T31 (carril 1) (ver punto 2.2.4, Sección “Resultados y Discusión”).

Esta estrategia, si bien da resultados positivos, presenta el inconveniente de que no puede realizarse a gran escala para procesar muchas colonias en simultáneo.

### 2.2.3.3. Análisis de clones productores de proteína por inmunoblot.

Se decidió analizar las colonias obtenidas de la transformación mediante inmunoblot de colonias (Wung y Gascoigne, 1996). En este caso se analizan los clones productores de proteína secretada, lo que implica que la región de ADN de interés debería estar integrada al genoma. La transferencia se realiza por capilaridad, sin la aplicación de pesos, por lo que se espera que las levaduras no sean lisadas. Este método tiene la ventaja de permitir el análisis de hasta 50 clones en simultáneo, por lo que se eligió como técnica preferida para el análisis de clones para seleccionar aquellos a usar a mayor escala. En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos.

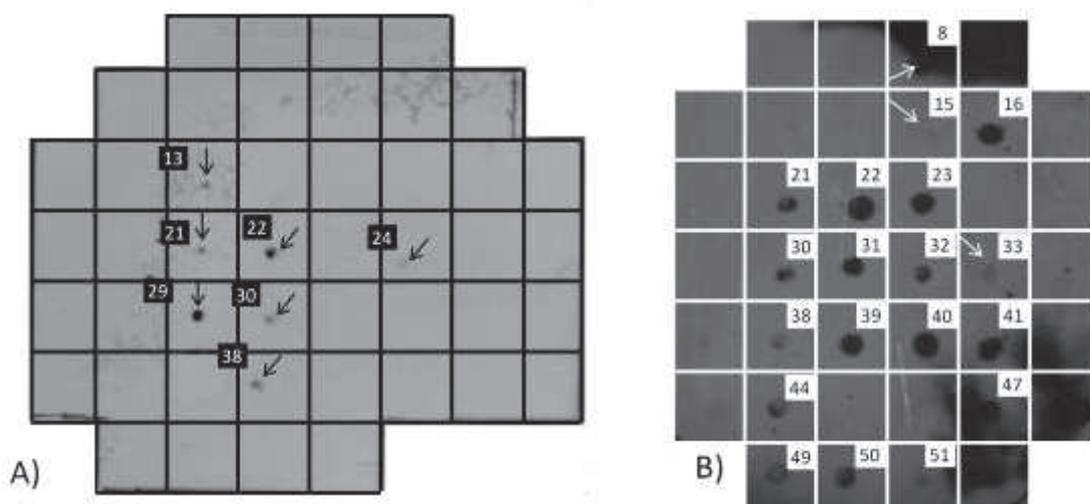


Figura 33: **Inmunoblot de colonias de *P. pastoris* transformadas con McCRISP2.** Expresión inducida con metanol durante tres días en placa y transferencia de las colonias a una membrana. Incubación con anticuerpo anti polihistidina (*Sigma – Aldrich*, dilución 1/2500) seguido de anticuerpo anti-IgG de ratón (*DAKO*, dilución 1/4000). Revelado quimioluminiscente. En A y B se muestran dos ensayos representativos de todos los realizados.

La numeración de colonias en la Figura 33, panel B se corresponde con la numeración de las colonias que dieron positivas en la verificación de la integración al genoma de la levadura mediante extracción de ADN genómico y PCR. Las colonias T31, T32 y T38 positivas mediante esta técnica también resultaron positivas en el análisis de la expresión por inmunoblot de colonia. Se ensayaron diversas condiciones de cultivo para estas colonias, además de para las colonias P22, P29 (panel A, Figura 33), las colonias T16 y T41 (panel B, Figura 33) y otras que no se muestran en esta figura (colonias R6, R18, R25 y R43).

#### 2.2.4. Ensayos de expresión.

Para la expresión de las colonias elegidas se siguieron los lineamientos sugeridos en el manual del *kit* utilizado (*EasySelect™ Pichia Expression kit, Invitrogen*).

Se incluyeron además de las colonias transformadas con *McCRISP2*, los controles incluidos en el *kit*. Se utilizó la cepa *GS115/His<sup>+</sup> Mut<sup>S</sup> Albumin* (denominada en este trabajo HSA) que contiene la proteína seroalbúmina humana con su péptido de secreción nativo integrada en el *locus* AOX1 del genoma de *P. pastoris* (cepa GS115). Esta cepa secreta albúmina (67kDa) al medio de cultivo a niveles mayores a 1g/L. Este control se utilizó en todos los ensayos de expresión realizados para verificar el funcionamiento de la inducción. En los primeros ensayos se incluyó el control *GS115/pPICZ/lacZ Mut<sup>+</sup>* (denominada en este trabajo LacZ). Esta cepa fue construida de acuerdo al protocolo realizado para integrar el gen *McCRISP2* en el genoma de la levadura bajo control del promotor AOX1. Produce intracelularmente la proteína  $\beta$ -galactosidasa fusionada a una cola de histidinas en su extremo C-terminal y presenta resistencia a Zeocina. Este control se incluyó para verificar la expresión intracelular de proteínas y como control de los ensayos de *Western blot* con un anticuerpo anti poli-histidina.

En la Figura 34 se muestra el resultado del análisis del medio de cultivo de la expresión de la colonia T38 (ver Figura 32 y Figura 33) mediante SDS-PAGE y tinción con *Coomassie Blue*. Se puede observar que las condiciones de expresión e inducción fueron las adecuadas ya que se observa claramente en el medio de cultivo la banda correspondiente a HSA (marcada con flecha negra, carriles 2 a 7). Sin embargo, para *McCRISP2* no se observa expresión en el medio de cultivo (carriles 9 a 13, se marca con una llave roja la región donde se espera observar la proteína recombinante).



Figura 34: **Fracción medio del ensayo de expresión #1.** SDS – PAGE al 15% en *buffer* Tris – Glicina teñido con *Coomassie blue*. **1:** HSA No Inducido, **2:** HSA inducido 1 día, **3:** HSA inducido 2 días, **4:** HSA inducido 3 días, **5:** HSA inducido 4 días, **6:** HSA inducido 5 días, **7:** HSA inducido 6 días, **8:** T38 No Inducido, **9:** T38 inducido 1 día, **10:** T38 inducido 2 días, **11:** T38 inducido 3 días, **12:** T38 inducido 4 días, **13:** T38 inducido 5 días, **14:** T38 inducido 6 días, **15:** Marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*). Se indican a la derecha del gel el tamaño de las bandas del marcador, con una flecha negra la banda correspondiente a HSA y con una llave roja la región donde se espera encontrar la proteína *McCRISP2*

Se intentó precipitar las proteínas del medio de cultivo con TCA pero el resultado fue el mismo (no se muestra). Se decidió entonces utilizar una técnica con mayor sensibilidad y realizar un *Western blot* para analizar las proteínas presentes en el medio de cultivo, utilizando el suero anti-McCRISP2 disponible. En la Figura 35 se muestra el resultado del ensayo utilizando además el suero preinmune como control negativo. Se puede observar en el panel A que lo único reconocido por el suero preinmune es una banda de alto peso molecular (flecha verde) que aparece en todos los carriles del *Western blot* con el suero anti-McCRISP2. Una búsqueda por homología (BLAST) utilizando la secuencia proteica de *McCRISP2* en el genoma de la cepa *GS115* de *P. pastoris* (<http://www.pichiagenome.org/>, De Schutter et al., 2009), indica que existen dos proteínas conteniendo el dominio SCP/TAPS, ambas con un peso molecular teórico de aproximadamente 30kDa. Choudhary et al. (2012) describen dos proteínas conteniendo dominio SCP/TAPS en *S. cerevisiae*, PRY1 y PRY2 que son secretadas al medio de cultivo y probaron que son O-glicosiladas, por lo que su peso molecular real en un SDS-PAGE es de aproximadamente 116kDa.

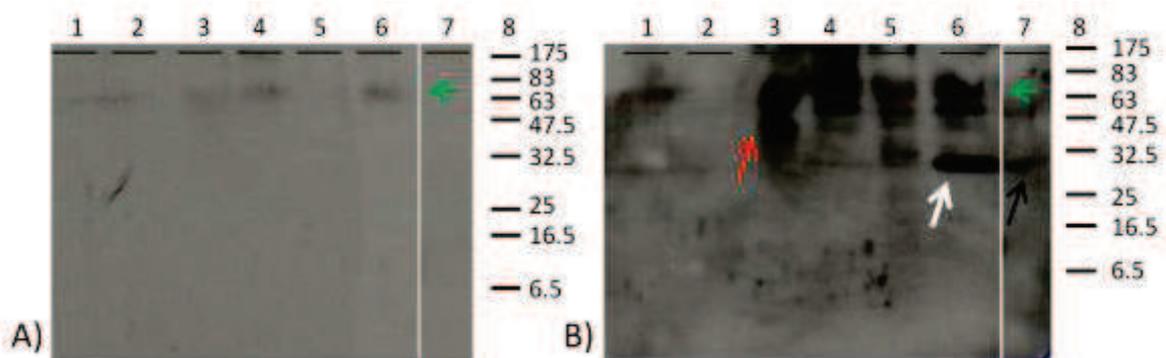


Figura 35: **Western blot** de las proteínas del medio de cultivo para determinar expresión en la colonia T38. En ambos casos se trató con suero anti-McCRISP2 o suero preinmune (según lo indicado en cada panel). Se reveló con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP diluido 1/5000 (*Sigma – Aldrich*) y se detectó mediante quimioluminiscencia (reactivo CPS-3, *Sigma – Aldrich*). **A)** Control negativo, incubación con suero preinmune diluido 1/1000. **B)** Incubación con suero anti-McCRISP2 diluido 1/1000. En ambos casos: **1:** Medio LacZ No inducido, **2:** Medio HSA No inducido, **3:** Medio LacZ inducido 6 días, **4:** Medio PUM inducido 6 días, **5:** Medio HSA inducido 6 días, **6:** Medio T38 inducido 6 días, **7:** Control positivo, McCRISP producida en *E. coli* purificada, **8:** Esquema del marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*). La flecha verde en A y B indica una proteína reconocida por el suero preinmune y la blanca una banda correspondiente al tamaño esperado para McCRISP2. Con una flecha roja se muestra una banda obtenida en el medio de cultivo de la cepa LacZ, cuyo tamaño no concuerda con el esperado.

Se puede observar la presencia de una banda del tamaño esperado para McCRISP2 (flecha blanca, carril 6, panel B, Figura 35). Se observan además otras bandas de mayor peso molecular, una de las cuales es reconocida por el suero preinmune. En ninguna de las demás muestras se esperaba obtener señal, ya que el antisuero no debería reconocer a LacZ (carril 3) o HSA (carril 5). En el caso de LacZ se observa una banda positiva (flecha roja) pero de tamaño menor al esperado para esta proteína (peso esperado 119kDa). Si se debiera a una proteína expresada por la levadura debería observarse en todos los carriles, lo cual no es el caso. En este caso se incluyó el medio de expresión para otra proteína McPUM1 (carril 4, peso molecular aproximado 40kDa) como un control no específico. Se debería haber repetido este ensayo con cantidades normalizadas de acuerdo a la densidad del cultivo, pero no se disponía de más muestra. De

todas maneras, si bien la colonia T38 parece expresar la proteína y secretarla al medio de cultivo, el rendimiento es bajo, ya que solo se logra detectar con un ensayo de *Western blot*.

Se decidió testear otro clon, ya que el manual sugiere ensayar la expresión de varios clones para analizar cuál es el mejor productor de proteína. En este ensayo se incluyeron los controles HSA y LacZ junto a la colonia T32. El análisis de las proteínas del medio de cultivo mostró que la inducción funcionó, ya que se detecta la proteína HSA como en el primer ensayo, pero no se detectó expresión de McCRISP2 (no se muestra).

Se decidió entonces procesar el sedimento de células para extraer las proteínas solubles, esperando detectar expresión de McCRISP2 en el interior de la célula debido a un fallo en la secreción. El resultado se muestra en la Figura 36. Se observa que la inducción funcionó, ya que se detecta la proteína LacZ (flecha roja, panel B) y se observa también la inducción del gen AOX1 (flecha negra, panel A y B). La cepa HSA es una cepa de fenotipo Mut<sup>S</sup>, esto significa que solo tiene la copia del gen AOX2, por el contrario, la cepa LacZ es de fenotipo Mut<sup>+</sup>, conteniendo las dos copias funcionales de los genes de utilización de metanol (AOX1 y AOX2). Ambas proteínas son muy similares, con el mismo peso molecular teórico (73,9kDa) (Zhang et al., 2009). El análisis de la banda señalada como AOX en la Figura 36 (flecha negra) permite verificar que estos fenotipos declarados son reales, ya que la banda correspondiente a la cepa HSA es menos intensa que la de la cepa LacZ. En el caso de McCRISP2, el clon T32 presentaría el fenotipo Mut<sup>+</sup>, ya que las bandas son de intensidad comparable a las de LacZ. Esta puede ser una alternativa para la determinación del fenotipo. En este trabajo se intentó realizar la determinación del fenotipo como sugiere el fabricante del *kit*, comparando el crecimiento de las levaduras en placas con medio conteniendo metanol. Sin embargo, el crecimiento de las colonias nunca fue concluyente y no se pudo determinar (no se muestra). En la mayoría de los ensayos de expresión se utilizó el protocolo de expresión sugerido para cepas de fenotipo Mut<sup>+</sup>.

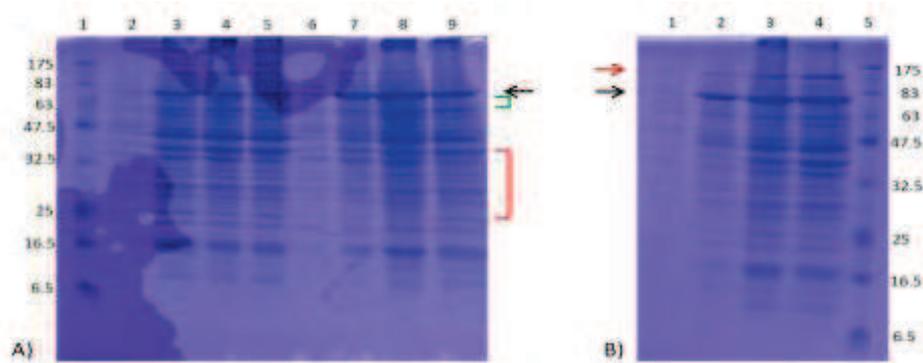


Figura 36: **Fraciones solubles del ensayo de expresión #2.** SDS – PAGE al 15% en *buffer* Tris – Glicina teñido con *Coomassie blue* **A)** HSA y T32. **1:** Marcador de peso molecular, **2:** HSA No Inducido, **3:** HSA inducido 1 día, **4:** HSA inducido 2 días, **5:** HSA inducido 3 días, **6:** T32 No Inducido, **7:** T32 inducido 1 día, **8:** T32 inducido 2 días, **9:** T32 inducido 3 días. La Flecha negra indica la banda correspondiente a los genes AOX (75kDa) que se inducen con metanol, la llave roja indica la región donde se espera encontrar a la proteína McCRISP2 y la verde la región donde se espera encontrar el control positivo HSA (67kDa). **B)** LacZ. **1:** LacZ No Inducido, **2:** LacZ inducido 1 día, **3:** LacZ inducido 2 días, **4:** Marcador de peso molecular. La Flecha negra indica la banda correspondiente a los genes AOX y la roja la banda correspondiente a LacZ (119kDa). Marcador de peso molecular: (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*). Se muestra el tamaño de las bandas del marcador.

Ni para HSA ni en McCRISP2 se observan bandas del tamaño esperado que sean diferenciales entre la fracción no inducida (carriles 2 y 6, panel A, Figura 36) y las fracciones inducidas. Se marca con una llave verde o roja respectivamente el peso molecular esperado para ambas proteínas. En el caso de McCRISP2, puede ser que no se esté expresando en esta cepa o que la proteína sea insoluble. Para HSA, se verificó la expresión en el medio de cultivo (no se muestra), pero por ser una proteína secretada, se debería obtener en la fracción insoluble ya que la misma es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, ingresando al lumen del mismo para seguir la vía de secreción al espacio extracelular. Si McCRISP2 se está expresando y enviándose a la vía secretoria podría esperarse lo mismo.

Para estas muestras no se realizó ensayo de *Western blot* ya que se busca obtener una colonia que exprese niveles de proteína altos, apreciables en un SDS-PAGE teñido con *Coomassie*.

Se decidió ensayar la expresión de dos clones positivos en inmunoblot de colonias (P22 y P29) utilizando matraces comunes y matraces acanalados para incrementar la agitación y obtener mayores densidades celulares, en busca de obtener mayor cantidad de proteína. En ninguno de los casos se obtuvo proteína McCRISP2 en el medio de cultivo, la fracción soluble, o la fracción insoluble, obtenida del sedimento descartado en la fracción soluble (no se muestra)

Se ensayaron diversas condiciones de expresión para otros clones (T31, T16, T41, R6, R18, R25 y R43, ver Tabla 4, sección “Materiales y Métodos”), cuyos resultados fueron siempre similares (no se muestra). Se intentó la expresión en las condiciones sugeridos por Jacobs et al. (2009), grupo que tiene amplia experiencia en la producción de proteínas en *P. pastoris*, pero los resultados siguieron siendo negativos

### 2.3. Resumen de resultados y Discusión general

En este capítulo se detallan las estrategias seguidas para la producción de proteína soluble en forma recombinante. De las estrategias utilizadas, la más eficiente, en cuanto que se logró obtener la proteína recombinante en condiciones levemente desnaturalizantes, fue el plegamiento en columna a partir de la proteína insoluble obtenida en *E. coli*. Se deberían realizar más ensayos, en nuevas condiciones para intentar mejorar el rendimiento. En particular, Echeverría et al. (datos no publicados) han logrado realizar el plegamiento en columna de dos proteínas con dominio SCP/TAPS de *E. granulosus* expresadas como fusión a GST en *E. coli*. Para ello, se siguió la misma estrategia de clonado y expresión descrita en este trabajo.

Con respecto a la expresión en diversas cepas de *E. coli* o la expresión como proteína fusionada a GST, los resultados presentados aquí son preliminares. Debido a la experiencia previa de expresión de McCRISP2 en *E. coli* (Costábile, 2009), solo se realizaron ensayos primarios para testear si alguna condición resultaba exitosa. Habría que intentar nuevas condiciones de expresión, a distintas temperaturas, en distintos medios de cultivo y con distintas concentraciones del agente inductor (IPTG). Se podría intentar la expresión bajo control de un promotor débil, de modo de no saturar la maquinaria de traducción, permitiendo así a la célula procesar las proteínas producidas. Se debería dar más énfasis a la cepa *SHuffle*, diseñada para la producción de proteínas ricas en enlaces disulfuro. Por otro lado, se ha reportado la expresión en *E. coli* en forma soluble de la proteína perteneciente a la superfamilia, Tci-ASP-1 del nematodo *Teladorsagia circumcincta* (Nisbet et al., 2013). Para ello se utilizó la cepa BL21 *CodonPlus – RIL* utilizada en este trabajo. La diferencia fue la utilización del vector *pET-SUMO* (Invitrogen), que permite expresar las proteínas de interés como fusión a la proteína SUMO

(*small ubiquitin-related modifier*) que potencia la solubilidad. Esto nos alienta a intentar producir la proteína McCRISP2 con distintas fusiones para verificar si realmente potencian la solubilidad de este tipo de proteínas. Además, existen vectores que permiten clonar el gen de interés fusionado a DsbC o DsbA. Estas proteínas son nativas de *E. coli* y catalizan la formación de enlaces disulfuro, además de presentar el péptido señal para la translocación al periplasma (Esposito y Chatterjee, 2006; Novagen, 2006). Esta fusión favorecería por lo tanto la producción de proteína soluble en el periplasma con los enlaces disulfuro apropiados. Algo a tener en cuenta es el efecto de la adición de diversos osmolitos al medio de cultivo que favorecen la estabilidad de las proteínas y minimizan la agregación de las mismas, así como también la co-expresión de chaperonas (de Marco et al., 2005; Hailu et al., 2013; Kolaj et al., 2009)

En el caso de la cepa *BL21 pLys*, en la que se obtuvieron dos bandas de tamaño similar en la fracción insoluble, una presuntamente exportada al periplasma, habría que optimizar la estrategia de obtención de la fracción periplásmica para verificar si esta hipótesis es correcta. Intentar otros métodos para lisar las bacterias, evitando la sonicación y la posible desnaturalización de proteínas, también es un factor a tener en cuenta. Cabe destacar que el congelado y descongelado sólo como técnica de lisis no fue suficiente para la lisis completa de las cepas analizadas en este trabajo.

La expresión en *P. pastoris* no fue una estrategia eficiente, a pesar de todas las ventajas reportadas para éste sistema. Si bien las levaduras son relativamente fáciles de manejar, comparado con otros sistemas de expresión eucariota, el proceso desde la transformación hasta la expresión y verificación de la expresión de unos pocos clones mediante *Western blot* lleva aproximadamente 2 a 3 meses. En total, en los ensayos reportados aquí, incluyendo la optimización de técnicas, se dedicó un año de trabajo de dedicación casi exclusiva a este punto. Tal vez, la realización de una pasantía en un laboratorio que utilice la expresión en levaduras como una técnica de rutina podría ser de utilidad, debido a que nuestra infraestructura no está preparada para dicha técnica. Dado que los ensayos de expresión, siguiendo los lineamientos sugeridos por fabricante del *kit*, llevan aproximadamente una semana, así como la incubación de las transformaciones con el ADN de interés, muchas veces se pierde el trabajo realizado debido a contaminaciones. Disponer de un flujo laminar para la preparación de los medios de cultivo y la manipulación de levaduras evitaría mucha de esta contaminación. Otra opción podría ser la utilización de la levadura *Hansenula polymorfa* (*syn. Pichia angusta*) que fue utilizada por el grupo del Dr. Tort en el Departamento de Genética (Facultad de Medicina – UdelaR) para la producción de la Catepsina L3 de *Fasciola hepática* (Corvo et al., 2009). Este es un sistema que crece a 37°C, una condición compatible con nuestro laboratorio. Además este grupo, con el cual tenemos una amplia colaboración, tiene optimizada la expresión en este sistema, por lo que se podría realizar una pasantía bajo su orientación.

Se deben optimizar muchos parámetros más para que esta sea una estrategia eficiente. Por ejemplo, la verificación de colonias recombinantes que hayan incorporado el gen de interés en el genoma de la levadura es un punto a destacar. En este trabajo se intentó durante mucho tiempo, con distintas colonias sin éxito, la verificación de la recombinación mediante PCR a partir de colonia. *A priori* parecería ser la técnica más sencilla, siendo que en el rastreo de colonias de bacterias es muy efectivo. Las bacterias son más fáciles de lisar, pero en el caso de levaduras, aun utilizando litocasa (enzima que hidroliza los glicanos de la pared celular de la levadura y facilita su lisis) no se logró obtener ninguna colonia positiva. En los ensayos realizados, se utilizó como control positivo el plásmido conteniendo la región codificante de

McCRISP2 utilizado para la inserción en el genoma y ADNg de una cepa verificada. Convendría haber utilizado por ejemplo la cepa *GS115/LacZ*, utilizada como control durante la expresión, como un control positivo del funcionamiento de la técnica. Esta cepa tiene insertado el gen de la  $\beta$ -galactosidasa en el genoma de *P. pastoris*, utilizándose la misma técnica de inserción que en el caso de *McCRISP2* (según lo reportado por el fabricante). Este control no es sugerido por el manual, pero debería servir para verificar que ocurre la lisis celular y las condiciones de reacción sean adecuadas. En el caso de las colonias que se quiere confirmar como positivas, no se sabe si es que la cepa no posee inserción en el genoma o si las condiciones de reacción no son adecuadas. De todas maneras, se debería obtener la banda para el gen *AOX1*, ya que teóricamente la recombinación no produce un reemplazo de secuencias, y si lo hiciera, ocurriría con baja frecuencia. Sin embargo, en este trabajo nunca se logró obtener esta banda.

Debido a que la estrategia de inmunoblot de colonias resultó efectiva, y permite analizar la integración en simultáneo al nivel de expresión de la proteína, se eligió esta técnica de rutina para la identificación de colonias recombinantes. Esta técnica, si bien permite analizar varios clones en simultáneo, dilata en el tiempo la verificación de colonias recombinantes, ya que se necesitan 3 días de inducción en medio con metanol más dos días de detección. Si funcionara la PCR a partir de colonia, en un día se podrían obtener los resultados.

Más allá de los problemas encontrados para identificar las colonias recombinantes, en los casos en que se verificó la integración al genoma, los ensayos a media escala, en matraces, en ningún caso permitió detectar proteína recombinante en el medio de cultivo como era el objetivo. Únicamente en el primer ensayo de expresión se visualizó proteína mediante *Western blot* en el medio de cultivo, pero no se puede descartar que se deba al reconocimiento por parte del suero anti-McCRISP2 de otras proteínas ya que se detectan bandas en las muestras que no expresan McCRISP2. Se debería haber repetido este ensayo para confirmar el resultado, pero la cantidad de muestra no fue suficiente. Por otro lado, en el experimento realizado de acuerdo a Jacobs et al. (2009), en donde se realiza la expresión en pequeños volúmenes y altas densidades celulares, no se obtuvieron resultados con el nivel de sensibilidad de un *Western blot*. Cabe destacar que en nuestras condiciones de trabajo, no se llega a alcanzar la densidad celular a la que los autores inducen la expresión. Esto puede ser un factor a tener en cuenta para explicar los resultados negativos.

La mayoría de los ensayos de expresión fueron realizados en colaboración con la Lic. Soledad Echeverría. Si bien no se ensayaron condiciones de expresión adicionales para McCRISP2, se continuaron testeando otras condiciones de expresión para las dos proteínas homólogas de *E. granulosus*. En todas las condiciones ensayadas, las proteínas obtenidas solo eran detectadas mediante *Western blot*, por lo que las cantidades de proteína producidas siempre fueron bajas. Además se encontró el inconveniente de la inestabilidad de las proteínas en el medio de cultivo. Cuando se realiza el análisis inmediatamente luego de culminar la expresión (en el lapso de 1 semana) las proteínas eran detectadas. Sin embargo, con el paso del tiempo, al ensayar la misma muestra almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , la proteína no era detectable. Esto llevó a analizar si esto se debía a precipitación de la proteína durante el almacenamiento o a degradación de la misma. Se verificó que la causa de la no detección era la degradación proteolítica, que fue revertida mediante la adición de inhibidores de proteasa durante la expresión de las proteínas. El almacenamiento del medio de cultivo a  $4^{\circ}\text{C}$  en lugar de a  $-20^{\circ}\text{C}$  también mejoró la estabilidad de las mismas.

Podría intentarse realizar la integración en el genoma con el péptido señal de secreción nativo

de la proteína McCRISP2 o utilizando los péptidos señal de las proteínas PRY de *P. pastoris* (Choudhary y Schneiter, 2012). Otra opción sería la expresión intracelular, lo cual no sería útil para introducir modificaciones post-traduccionales, pero podría mejorar el rendimiento.

Como conclusión general, se puede decir que la expresión en *E. coli* y plegamiento en columna parece ser la estrategia más ventajosa en relación al rendimiento y al tiempo. Como se mencionó hay diversos parámetros por optimizar.

### 3. Análisis de la expresión de McCRISP2 a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*

#### 3.1. Análisis temporo – espacial del mensajero codificante para McCRISP2

##### 3.1.1. Análisis de la expresión temporal por PCR cuantitativo

Se analizó el nivel de transcripción del gen *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti* mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativo (RT-qPCR). Para ello se extrajo ARN de organismos que presentaban distintos niveles de desarrollo, entre tetratiridio (0 y 2 días de cultivo) y gusano adulto segmentado (10 días de cultivo), incluyendo gusanos alargados (4 días de cultivo), gusanos con principio de segmentación (6 días de cultivo) y gusanos segmentados no adultos (8 días de cultivo). Con esto se busca analizar si el ARN mensajero *McCRISP2* varía en su nivel de expresión y nos puede permitir acercarnos a la inferencia de un rol en la biología del parásito.

Los ensayos de RT-qPCR se realizaron bajo la orientación del Dr. Juan Martín Marqués en su laboratorio, en el marco de una pasantía local del PEDECIBA.

##### 3.1.1.1. Diseño experimental y justificación de la estrategia

###### 3.1.1.1.1. Obtención de organismos y réplicas

En una primera instancia se realizaron triplicados del cultivo, a partir de organismos obtenidos del mismo ratón. Con esto se puede analizar si la expresión de los genes estudiados varía entre los distintos cultivos. En instancias posteriores se había planificado la realización de la curva de desarrollo con organismos obtenidos de dos ratones diferentes para analizar si existía variabilidad en la expresión de los genes entre diferentes condiciones de proliferación *in vivo*. Sin embargo, por diversas complicaciones se dificultó la obtención de organismos en estadíos del desarrollo similares a los obtenidos en la primera instancia y la realización de estas réplicas queda pendiente.

###### 3.1.1.1.2. Preparación del ADNc

Para la retrotranscripción se eligió una estrategia de cebado al azar (*random priming*), que permite obtener una representación de todos los tipos de ARN presentes. Además evita los sesgos debido al enriquecimiento de mensajeros cortos o la pérdida de mensajeros con el extremo 3' degradado que se producirían al sintetizar el ADNc con un cebador oligo-dT.

Sobre una muestra elegida al azar se realizaron controles con ARN sin tratar con DNasa y/o sin retrotranscribir en sus posibles combinaciones: con DNasa/sin RT, sin DNasa/con RT y sin DNasa/sin RT, además de la reacción idéntica para todas las muestras con DNasa/con RT. Estos controles permiten determinar la pertinencia de realizar el tratamiento con DNasa y si el mismo interfiere con la reacción de retrotranscripción. Los controles realizados y el objetivo de cada uno se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Controles realizados para determinar la calidad del ADNc utilizado en las reacciones de qPCR

Denominación de la reacción	Condición		Objetivo
	DNasa	RT	
<b>c/c</b>	SI	SI	Reacción que se utilizará para la cuantificación y permite la comparación con los controles.
<b>s/c</b>	NO*	SI	Confirma que el tratamiento con DNasa no afecta las reacciones posteriores (RT o PCR). Se espera obtener un valor de Ct en qPCR menor o igual a la muestra c/c.
<b>c/s</b>	SI	NO	Verifica si el tratamiento con DNasa fue efectivo. Se espera no tener amplificación, u obtener un valor de Ct en qPCR muy grande.
<b>s/s</b>	NO*	NO	Indica si es necesario realizar el tratamiento de la muestra con DNasa. Si no se observa amplificación, el tratamiento se puede evitar.
<b>Agua</b>	--	--	Indica ausencia de contaminación en los reactivos utilizados en la reacciones.

\* Estos controles no se realizaron con una incubación en idénticas condiciones omitiendo la DNasa, sino que se utilizó el ARN obtenido inicialmente sin tratar.

### 3.1.1.1.3. Diseño de cebadores

En el caso de *McCRISP2* se diseñaron dos juegos de cebadores para analizar experimentalmente cual presentaba mayor eficiencia y especificidad. En la Figura 37 se muestra la secuencia de *McCRISP2* y la región donde hibridan los cebadores.

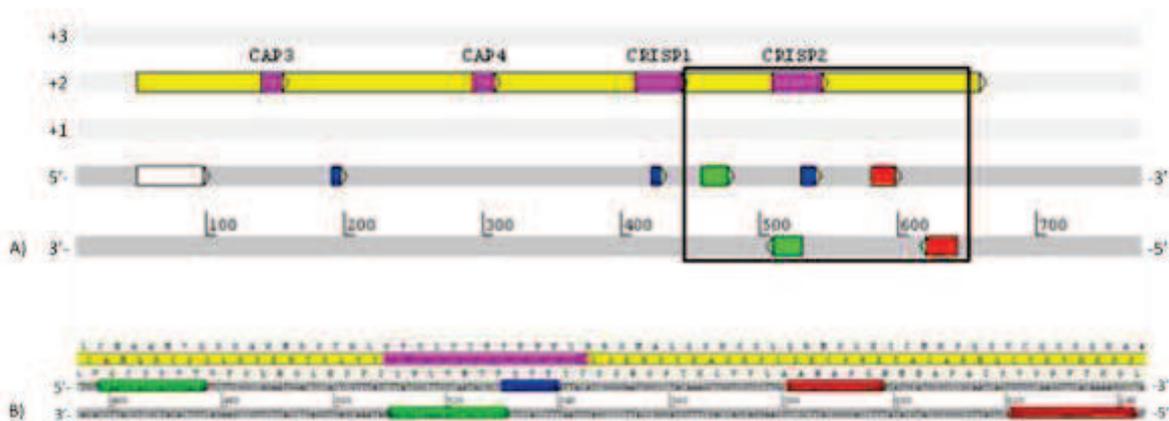


Figura 37: Mapa del transcritpo *McCRISP2* y ubicación de los cebadores. **A)** En amarillo se señala la secuencia proteica en el marco +2. En violeta se muestran los motivos característicos de la superfamilia y en blanco el péptido señal de secreción predicho sobre la hebra codificante del ADNc. En azul se muestran los límites de los exones. En rojo y verde se muestra la ubicación de los pares de cebadores diseñados (*McCRISP2\_a* y *McCRISP2\_b* respectivamente). **B)** Ampliación de la región enmarcada con un cuadro negro en A).

Es importante recordar que *McCRISP2* pertenece a una familia génica, y en el caso de *M. corti* se han aislado 10 transcritos (4 previos y 6 en este trabajo). Es necesario que los cebadores diseñados sean específicos para amplificar únicamente el transcripto de interés y no otros pertenecientes a la superfamilia.

Según esto, el juego de cebadores McCRISP2\_a es el mejor, ya que los cebadores mapean en la región menos conservada del gen (extremo 3', cuadros rojos en Figura 37). De todas maneras, en ensayos preliminares, estos cebadores no dieron curvas de amplificación con la forma deseada, indicando que la eficiencia de este par no era óptima (no se muestra). Por esta razón se utilizó el juego de cebadores McCRISP2\_b que presentó mejor eficiencia de amplificación (cuadros verdes en la Figura 37).

Además, para verificar que el único gen que se estuviera amplificando fuera el de interés, los productos de PCR obtenidos se clonaron y secuenciaron. Para todos los puntos de la curva se analizaron dos clones, siendo todos de idéntica secuencia e idénticos a *McCRISP2* (Figura 38). Con esto se confirma que no se está amplificando *McCRISP4*, ya que en la región incluida entre los cebadores existen 9 diferencias con *McCRISP2*. Sin embargo, no puede descartarse que se esté amplificando otro gen parálogo muy conservado

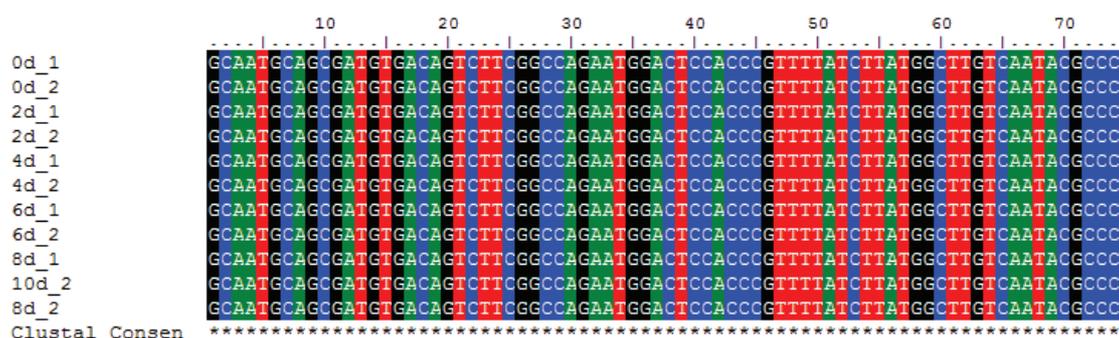


Figura 38: **Alineamiento de las secuencias obtenidas de los productos de amplificación.** Realizado con el programa *ClustalX* utilizando los parámetros por defecto. Debajo de las secuencias se muestra la conservación con asteriscos. La secuencia de la muestra 10d\_1 reveló la amplificación de un dímero de cebadores y se excluyó del alineamiento.

### 3.1.1.2. Validación genes de referencia

Para realizar la cuantificación relativa de un ARNm, es necesario contar con un gen de referencia, cuyo nivel de expresión no cambie a lo largo del desarrollo. Se reportó en *H. microstoma* el estudio de genes de expresión presuntamente constitutiva a lo largo del desarrollo (Pouchkina-Stantcheva et al., 2011) donde se concluye que ninguno de los genes estudiados sirve como gen de referencia. Estos genes presentan una amplia variación en su nivel de expresión en las condiciones estudiadas ( $\beta$ -tubulina, subunidad 2 de la ARN polimerasa II, proteína ribosomal 28L de la subunidad 60S, ADNr 18S y proteína quinasa A dependiente de AMPc).

En este trabajo se buscó en la base de datos del *NCBI* genes de *M. corti* que presentaran una expresión presuntamente constitutiva para validarlos como genes de referencia durante el desarrollo estrobilar. Los genes elegidos fueron Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa

(*GAPDH*), Tropomiosina 1 de alto peso molecular (*TPM*) y el gen para el ARN ribosomal 18S (*18S*). Los genes *GAPDH* y *18S* son utilizados usualmente como genes de referencia, mientras que el gen *TPM1* no presenta variaciones apreciables en la cantidad de proteína producida (Koziol et al., 2011). La inclusión de este gen en el análisis tiene el doble objetivo de validarlo como gen de referencia en estas condiciones y verificar que los niveles de expresión no varían tampoco a nivel de ARNm.

Una vez obtenidas las curvas de amplificación, se corrigieron por el ruido de fondo y se determinó un valor de fluorescencia arbitrario en la región exponencial de la curva para determinar el valor de ciclo umbral (Ct: ciclo fraccional donde se alcanza un cierto valor arbitrario de fluorescencia).

Para analizar si estos genes presentaban variación en su nivel de expresión en las condiciones ensayadas se utilizó el método  $2^{-\Delta Ct'}$  (Livak y Schmittgen, 2001), siendo  $\Delta Ct' = Ct_{\text{gen A, tiempo x}} - Ct_{\text{gen A, tiempo 0}}$ .

Una inspección visual de los valores de Ct obtenidos y los consiguientes valores de  $2^{-\Delta Ct'}$  permiten inferir que en organismos sin cultivo (0d) los niveles de ARNm presentes son muy diferentes a los obtenidos para los organismos que fueron cultivados. Esto es explicable, ya que estos organismos sin cultivar se almacenaron a 4°C y se encuentran bajo estrés, como se verifica por su morfología (no se muestra) y a nivel proteómico (Canclini y Esteves, 2007). De todas maneras se analizó cuantitativamente como variaban los valores cuando se calcula  $2^{-\Delta Ct'}$  en referencia al día 0 (sin cultivo) o en referencia al día 2 (2 días de cultivo). Para verificar la significancia de la variación se realizó el test estadístico de análisis de varianza (ANOVA). En la Tabla 17 del Apéndice 6 se muestran en detalle los valores obtenidos y los cálculos realizados mientras que en la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos para la variación del valor de  $2^{-\Delta Ct'}$  en las condiciones ensayadas.

Como se puede observar en esta figura, la variación es mayor cuando se realiza la normalización con respecto al día 0. En los genes *TPM* y *18S*, esta variación no es tan marcada, sin embargo normalizando respecto a la condición con 2 días de cultivo, los valores son más cercanos a 1 (sin cambio en el nivel de expresión, ver Figura 39). Por este motivo se decidió realizar los cálculos de la variación de expresión de *McCRISP2* respecto al día 2. El gen que presenta menor variación es *18S*, sin embargo, este gen se encuentra en un alto número de copias (como lo demuestra su valor de Ct, en este caso en el entorno de 4, ver Tabla 17, Apéndice 6). Sería conveniente utilizar para la amplificación de este gen una mayor dilución del ADNc para que los valores sean más confiables por no saturarse la reacción rápidamente. Debido a que los valores obtenidos no son comparables con los de *McCRISP2*, este gen fue descartado del análisis. De los genes restantes, *GAPDH* parece ser el más confiable, ya que es el menos variable y con valores más aproximados a 1 (Ver Figura 39).

Al analizar la variación de la expresión de *McCRISP2*, se constata que a los 0 días de cultivo, los niveles de mensajero son significativamente mayores a los niveles observados en los organismos cultivados (aproximadamente 30 veces mayor a la condición de tetratiridios con 2 días de cultivo). Esto hace que al comparar los niveles de expresión con este día, las variaciones en días posteriores sean imperceptibles. Esto confirma que es más conveniente hacer el cálculo de la razón de cambio en el nivel del ARNm a lo largo del desarrollo con respecto al día 2 (tetratiridios). Esto, además, permite verificar que efectivamente hay un cambio en el nivel de expresión del ARNm *McCRISP2* que es significativo ( $p < 0.05$ ).

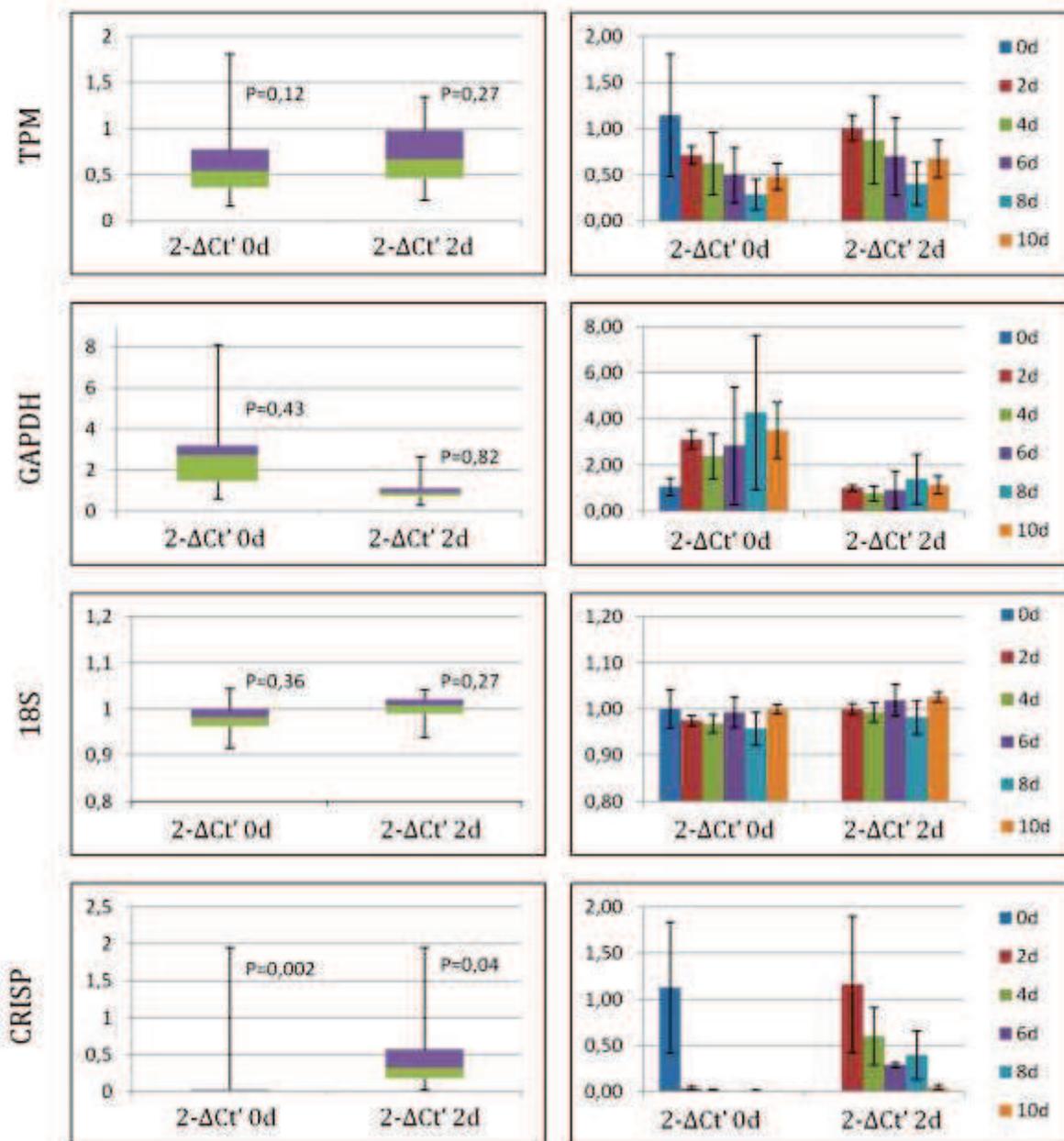


Figura 39: **Análisis de la expresión de los genes de referencia y del gen *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar.** A la izquierda se muestran los gráficos *box and whiskers* mostrando la variabilidad en el valor de  $2^{-\Delta Ct'}$  de los distintos genes según la condición de referencia (sin cultivo (0d) o con 2 días de cultivo (2d)). El rectángulo representa los valores que se encuentran entre los percentiles 25 y 75 y el cambio de color se da en el valor donde se encuentra la mediana. Las barras representan los valores máximo y mínimo. Se muestra sobre cada gráfico el valor p obtenido para el análisis de varianza. A la derecha se muestran los valores de  $2^{-\Delta Ct'}$  promedio para cada día respecto a ambas condiciones de referencia estudiadas. Las barras representan la desviación estándar de cada grupo. Tener en cuenta las diferencias en las escalas para los distintos genes.

### 3.1.1.3. Validación de las técnicas de extracción de ARN y retrotranscripción

Para que los valores de Ct obtenidos para realizar el análisis sean confiables, es necesario verificar que el producto de amplificación procede de ARN y que no se están amplificando trazas de ADNg remanente en la preparación u otro ADN contaminante. En la Figura 40 se muestran las curvas de amplificación obtenidas para los controles de la calidad del ADNc (Tabla 9), utilizando los cebadores *GAPDH*. Las curvas para los restantes genes tienen un perfil similar (no se muestra).

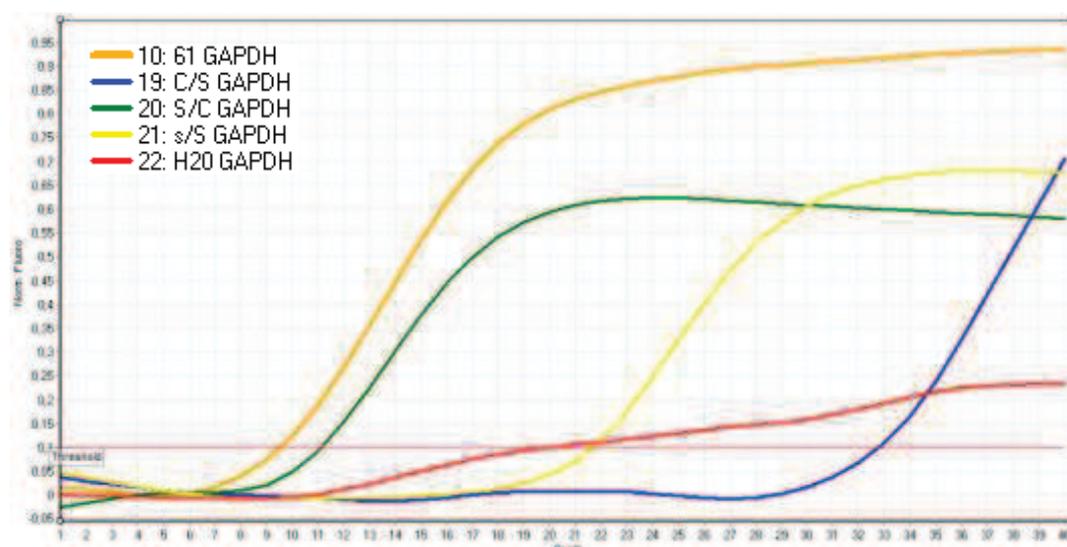


Figura 40: **Curvas de amplificación de la muestra 6d#1 y los respectivos controles.** En anaranjado se observa la muestra tratada con DNasa y sometida a Retrotranscripción (reacción normal). En verde, la muestra sin tratar con DNasa y sometida a retrotranscripción. En amarillo la muestra sin tratar con DNasa y sin retrotranscribir. En azul la muestra tratada con DNasa y sin retrotranscribir. En rojo el control negativo sin molde.

En esta figura se refleja claramente la necesidad de realizar el tratamiento con DNasa. Al comparar la curva azul (con DNasa, sin RT) con la amarilla (sin DNasa, sin RT) se observa que en la segunda hay ADN molde que es amplificado (aproximadamente en el ciclo 22), correspondiente a ADNg co-purificado con el ARN en la extracción. En cambio, en la curva azul, donde no hay ADN ya que no se realizó retrotranscripción y se trató con DNasa, se observa una amplificación residual en el ciclo 33. La curva verde muestra que el tratamiento con DNasa no afecta la reacción de retrotranscripción, ya que la forma de la curva es similar, y el valor de Ct obtenido es del orden del obtenido para la muestra que si fue tratada con DNasa (curva anaranjada). En la Tabla 10 se muestran los valores obtenidos y puede observarse que las tendencias se mantienen para los tres juegos de cebadores

Tabla 10: Valores de Ct obtenidos para los controles de calidad del ADNc utilizando los distintos cebadores

Muestra	Condición		Ct		
	DNasa	RT	<i>GAPDH</i>	<i>CRISPb</i>	<i>TPM</i>
6#1	SI	SI	11,1	21,0	13,3
6#1	SI	NO	32,8	31,0	>40
6#1	NO	SI	11,1	17,8	14,3
6#1	NO	NO	21,7	19,8	25,2
Agua			19,9*	>40	>40

\*Este valor se considera despreciable debido a la forma de la curva de amplificación (ver Figura 410)

Además, por el método de cálculo de la razón de cambio del nivel de ARNm, es necesario que no haya inhibidores en la reacción, ya que se asume que la eficiencia de reacción es cercana a 1. Para realizar el cálculo de la eficiencia se deben realizar diluciones seriadas del ADNc a utilizar como molde y verificar que la pendiente del gráfico Logaritmo (Ct) vs Concentración (ADNc) es cercana a 0. En este trabajo, no se ha realizado el cálculo de eficiencia de esta manera. Sin embargo, analizando las curvas de reacción (Figura 41) puede predecirse si hubo algún problema en la eficiencia de la amplificación. En la mayoría de las curvas se observa el perfil característico de una amplificación eficiente. También analizando la distribución de las curvas puede verificarse que los genes de referencia no varían en gran medida para las condiciones ensayadas.

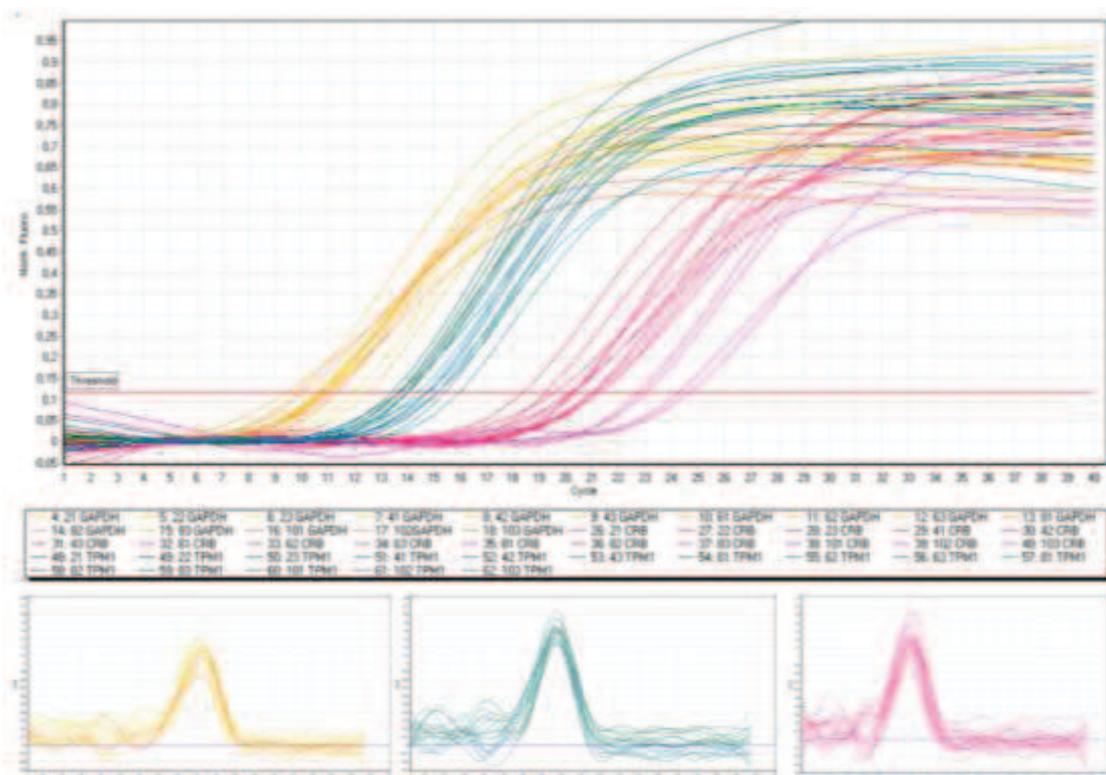


Figura 41: Curvas de amplificación y curvas de fusión de los genes estudiados. A) Curvas de amplificación. En tonos de amarillo curvas correspondientes a *GAPDH*, en tonos azules curvas correspondientes a *TPM* y en tonos de rojo curvas correspondientes a *McCRISP2*. B) Curvas de fusión. Se mantiene el código de colores de la figura anterior. En todos los casos se observa un único pico.

También es necesario que no se esté amplificando un producto inespecífico, ya que contribuiría al valor de Ct (esto podría evitarse utilizando sondas *TaqMan* (Kubista et al., 2006)). En la Figura 41 se presentan las curvas de fusión de los tres genes en estudio. Puede observarse un único pico para todas las muestras. En el caso de *McCRISP2* se verificó la identidad de los productos de amplificación mediante secuenciación como se mencionó previamente.

#### 3.1.1.4. Análisis del cambio en la expresión de *McCRISP2*

Una vez que se verificó que las condiciones de reacción y los controles funcionaron como era esperado, se procedió a realizar el cálculo de la razón de cambio en la expresión de *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar. Para ello se calculó la razón de cambio de la cantidad de *McCRISP2* normalizada a dos genes de referencia (*GAPDH* y *TPM*) en tetratiridios (2d de cultivo). En la Tabla 18 (Apéndice 6) se muestran los valores obtenidos al utilizar el gen *GAPDH* como referencia y en la Tabla 19 (Apéndice 6) cuando se utiliza *TPM* como referencia.

En la Figura 42 se muestra gráficamente la razón de cambio para *McCRISP2* en relación a los genes de referencia *GAPDH* y *TPM*. En ambos casos se puede observar que la variación es similar en cuanto a su dispersión y que la expresión de *McCRISP2* disminuye a medida que progresa el desarrollo. En el caso de la normalización respecto a *TPM*, en el día 8 hay un aumento en el valor promedio de la expresión respecto al promedio del día 6, aunque la dispersión de los valores es mayor. Realizar los análisis con un mayor número de réplicas tanto técnicas como biológicas permitirá apoyar esta desviación respecto a la tendencia, además de confirmar los resultados preliminares obtenidos en este trabajo.

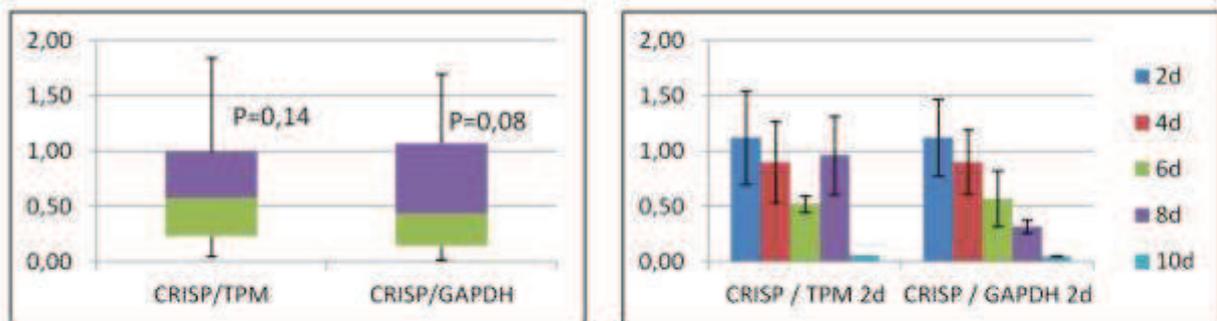


Figura 42: **Razón de cambio de *McCRISP2* respecto a los distintos genes de referencia.** A la izquierda se muestran las gráficas *box and whiskers* mostrando la variación en los cambios del nivel de expresión de *McCRISP2* respecto a *GAPDH* y *TPM* tomando como condición de referencia los organismos con 2 días de cultivo (2d). El rectángulo representa los valores que se encuentran entre los percentiles 25 y 75 y el cambio de color se da en el valor donde se encuentra la mediana. Las barras representan los valores máximo y mínimo. Se muestra sobre cada gráfico el valor p obtenido para el análisis de varianza. A la derecha, los valores promedios de la variación para cada estadio de desarrollo. Las barras de error representan la desviación estándar.

El análisis de los valores *p* obtenidos en el test de análisis de varianza (indicados en la figura) permite rechazar la hipótesis nula (el nivel de expresión de *McCRISP2* es constante a lo largo del desarrollo) con una confianza del 10% en el caso de la normalización con respecto a *GAPDH*. En el caso de *TPM1*, no se puede rechazar la hipótesis nula, probablemente debido al valor

separado del resto obtenido a los 8 días. La repetición de estos experimentos permitirá corroborar estos resultados preliminares y determinar si efectivamente el nivel de expresión del ARN mensajero *McCRISP2* disminuye a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*.

### 3.1.2. Análisis de la expresión espacial

Para el análisis de la expresión espacial del ARNm se realizaron hibridaciones *in situ* sobre criocortes u organismos enteros (*in toto*). Para ello se utilizó una sonda antisentido complementaria a la región codificante completa para *McCRISP2*. En la Figura 43 se muestra el resultado de la hibridación *in situ* sobre criocortes.

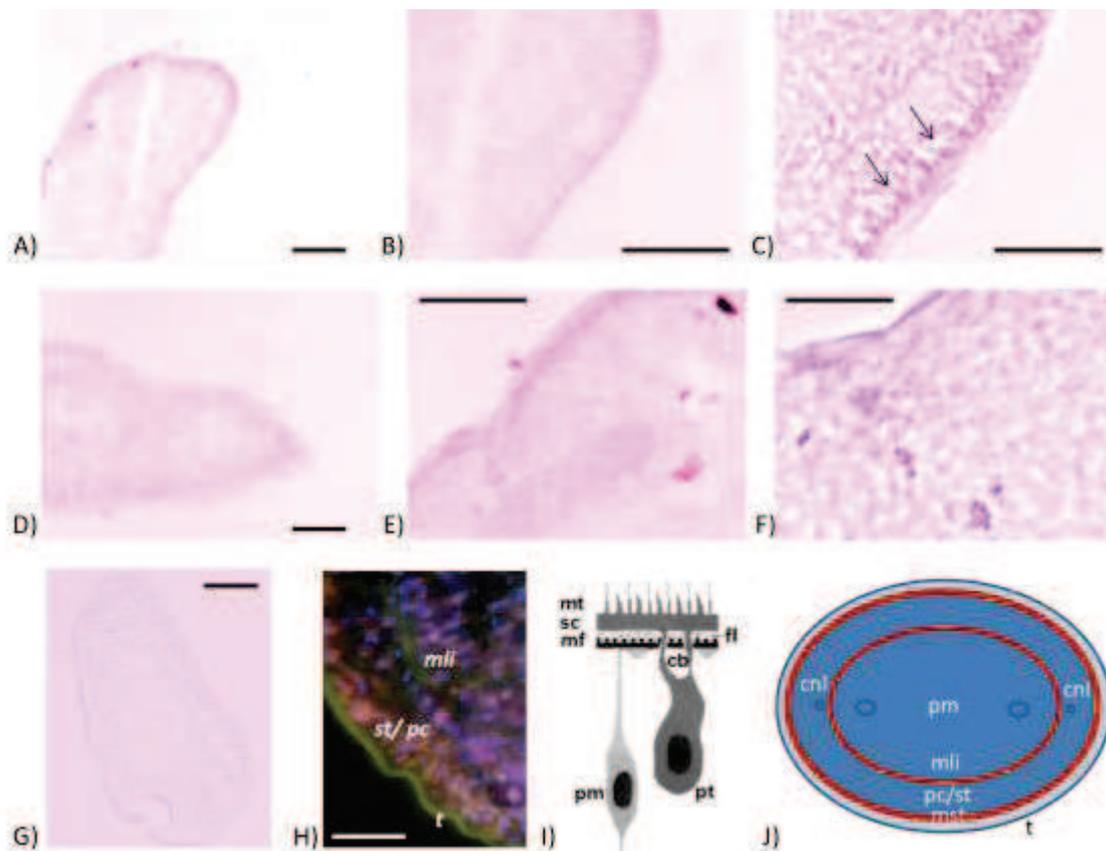


Figura 43: **Hibridación *in situ* sobre criocortes.** **A a F)** Organismos con 8 días de cultivo, cortes transversales. Incubación con 1.5ng/μl de sonda antisentido *McCRISP2* marcada con Digoxigenina. Revelado con anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina y detección con NBT-BCIP. Se muestran imágenes de dos cortes con aumento progresivo. Las flechas señalan la región donde se observa señal. **G)** Organismo con 8 días de cultivo, corte longitudinal a nivel del escólex. Control negativo sin sonda. **H)** Imagen donde se muestran las distintas regiones de un organismo en un corte sagital. Abreviaturas: *mli*: musculatura longitudinal interna, *st/pc*: subtegumento/parénquima cortical, *t*: tegumento. **I)** Esquema detallado de la región tegumentaria y subtegumentaria en un corte longitudinal. Abreviaturas: *mt*: microtricos, *sc*: citoplasma superficial (tegumento), *fl*: capa fibrosa, *cb*: puentes citoplasmáticos, *pt*: cuerpo perinuclear del tegumento (citón tegumentario), *mf*: fibras musculares subtegumentarias circulares (externas) y longitudinales (internas), *pm*: cuerpo celular de sistema muscular subtegumentario. **J)** Esquema de la organización general en un corte transversal en la región posterior al escólex. Abreviaturas: *cni*: cordón nervioso lateral, *pm*: parénquima medular, *mli*: musculatura longitudinal interna, *st/pc*: subtegumento/parénquima cortical, *t*: tegumento. H a J tomadas de Koziol (2010). Las barras representan 100μm, excepto en C y F que representan 50μm y en H que representa 20μm.

Se puede observar claramente la señal en la región subtegumentaria (Panel C, marcado con flechas). Esta localización ocurre a lo largo de todo el perímetro del organismo en el corte analizado.

Para analizar si esta expresión es mantenida a lo largo de todo el cuerpo del organismo y si hay cambios en la distribución de la expresión, se realizaron hibridaciones *in toto* sobre organismos en diferentes estadios de desarrollo, obteniéndolos tras 3, 5, 10 y 13 días de cultivo. Cabe resaltar la dificultad de sincronizar los tiempos de desarrollo del organismo en el cultivo *in vitro*. El grado de desarrollo alcanzado tras ciertos días de cultivo es diferente de acuerdo a la partida de organismos, existiendo una ventana de tiempo (determinados días en cultivo a partir de diferentes partidas de organismos alcanzan distintos estados de desarrollo). Además, no contamos con marcadores o anticuerpos que nos permitan discriminar finamente los tiempos de desarrollo. No se puede saber si el aparato reproductor se encuentra desarrollado o si al menos existen rudimentos genitales, por ejemplo. En este trabajo se separaron manualmente los organismos bajo lupa en base a su morfología, de acuerdo al grado de segmentación alcanzado. Así, los organismos con 3 días de cultivo corresponden a tetratiridios, los de 5 días a tetratiridios elongados, los de 10 días a organismos adultos con segmentación visible (presuntamente con rudimentos genitales) y los de 13 días a organismos adultos con segmentación avanzada y mayor número de proglótides (estadios más desarrollados, presuntamente con estructuras sexuales primarias ya desarrolladas).

Los resultados de la hibridación *in toto* en organismos con distintos días de cultivo se muestran en la Figura 44 (tetratiridios y tetratiridios elongados) y en la Figura 45 (gusanos adultos segmentados).

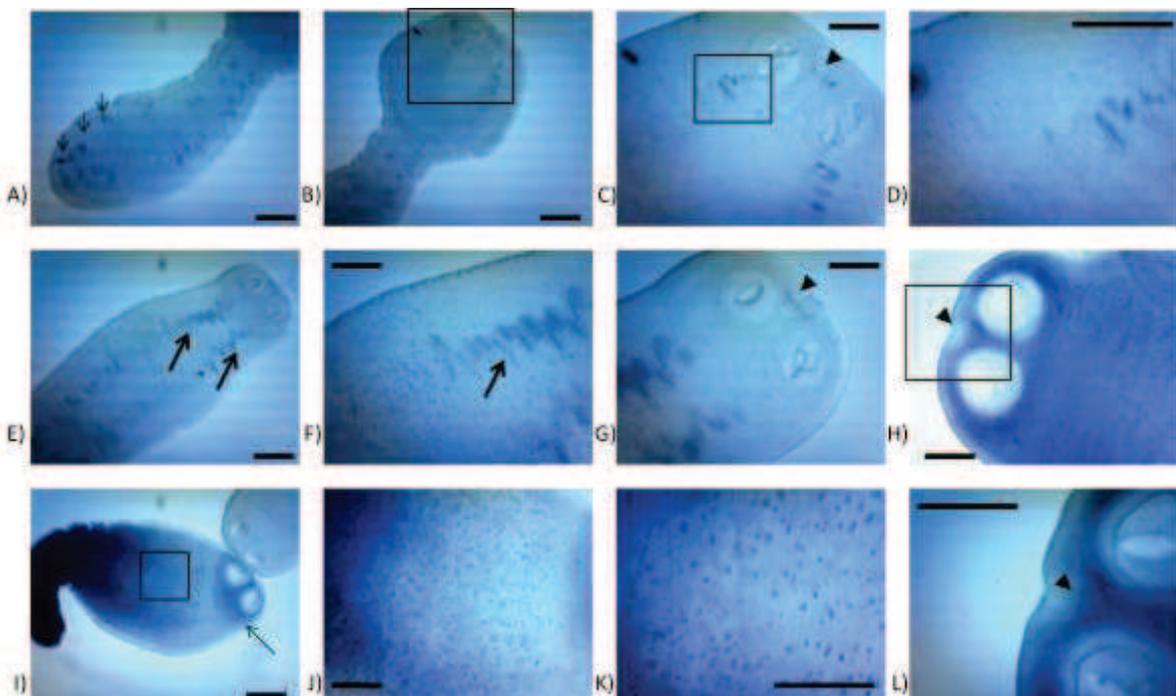


Figura 44: Hibridación sobre organismos enteros con la sonda McCRISP2\_Organismos sin segmentar. A) a D): 3 días de cultivo (tetratiridios), E) a L): 5 días de cultivo (gusanos elongados). El tamaño de las barras corresponde a 200 $\mu$ m en A, B, E e I y a 100 $\mu$ m en C, D, F a H, J a L. Los recuadros en B y C indican las regiones ampliadas en C y D respectivamente; en H e I las regiones ampliadas en L y J. Las puntas de flecha indican la región del macizo apical, las flechas largas canales excretorios y las cortas puntos discretos de tinción.

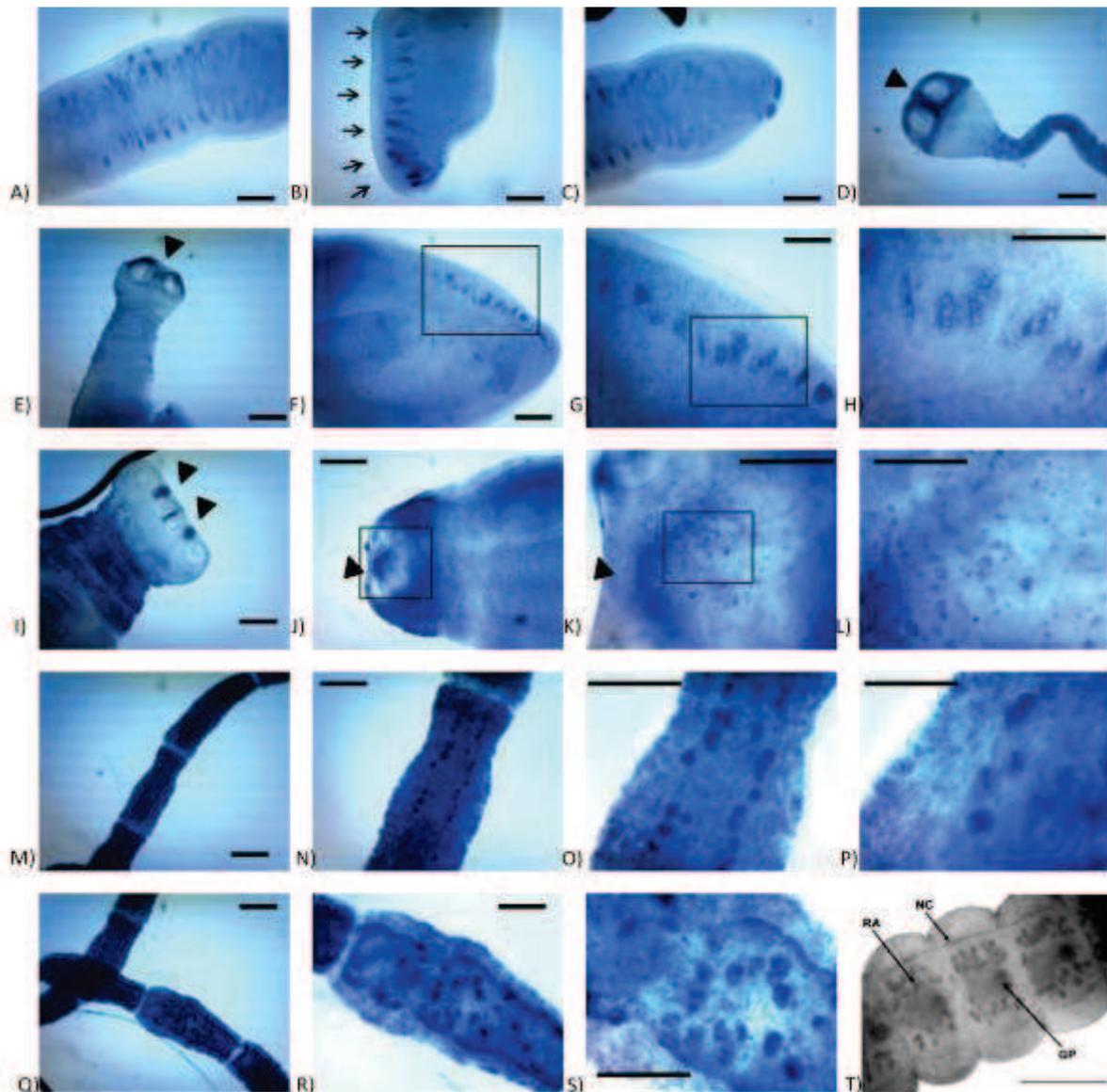


Figura 45: **Hibridación sobre organismos enteros con la sonda McCRISP2\_Organismos segmentados.** **A) a L)** 10 días de cultivo (segmentados sin madurez sexual) e **M) a S)** 13 días de cultivo (segmentados con mayor madurez sexual). El tamaño de las barras corresponde a 200 $\mu$ m en A a E, I, M y Q; a 100 $\mu$ m en F, G, J, N, O, R y S y a 50 $\mu$ m en H, K, L y P. **T)** Tinción del sistema nerviosos de un organismos segmentado. RA: Aparato reproductor, NC: Cordón nervioso, GP: Poro genital. La barra representa 100 $\mu$ m (tomado de Kemmerling et al., 2006).

En los organismos menos desarrollados, 3 y 5 días (Figura 44), se observa señal en la región incluida en el macizo apical, aunque no en la totalidad del macizo descrito por Hess (1980) (paneles C, G, H y L, punta de flecha). En un tetratiridio que comenzó a degenerar (panel I) se observa una tinción más generalizada, muy fuerte en la región posterior y en toda la región anterior rodeando a las ventosas (marcado con una flecha). Se observa también una serie de puntos discretos a lo largo de toda la superficie del organismo (ampliaciones de la región recuadrada en I, paneles J y K). Además se observa en la mayoría de los ejemplares analizados lo que parece ser el canal excretorio (flechas largas en E y F). En el panel A se muestra con flechas cortas la localización de señal en regiones discretas de mayor tamaño, que podrían corresponder con los poros excretores formados durante la multiplicación asexual. Cabe

destacar que estos organismos fueron incubados a 60°C para inactivar la fosfatasa alcalina endógena. Arsac et al. (1997) reportaron actividad fosfatasa alcalina endógena en el sistema excretor de gusanos segmentados de *E. multilocularis*, así como en el tegumento de proglótides grávidos. No se reportó actividad en organismos sin segmentación. En controles negativos de rutina realizados durante la técnica, en los que se incuban los organismos sin sonda o sin anticuerpo, la reacción es negativa, como es de esperar (no se muestra). Esto indica que la señal observada para McCRISP2 no se debería a una reacción inespecífica o a una acumulación de reactivos en el lumen de los túbulos excretores. Sería recomendable confirmar estos resultados mediante el revelado con un anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a peroxidasa en lugar de fosfatasa alcalina.

Puede apreciarse, que la presencia de señal es variable en los distintos estadios del desarrollo, habiendo mayor señal en estadios más desarrollados (Figura 45). Esto puede deberse a una mayor permeabilidad del tegumento en gusanos segmentados. En organismos de 13 días de cultivo (paneles M a S) se observa expresión discreta en los proglótides más posteriores, en la región del parénquima cortical para un proglótide más anterior y por lo tanto menos desarrollado (Paneles M a P, cada foto sucesiva es una ampliación de la anterior) o distribuidos en todo el parénquima para un proglótide más posterior (Paneles Q a S, cada foto sucesiva es una ampliación de la anterior), con mayor grado de desarrollo. Estas estructuras podrían corresponder con testes y estructuras reproductoras o primordios de los mismos (ver Figura 4 de la Introducción). En organismos con 10 días de cultivo (Paneles A a L) también se observa señal en estructuras similares, que pueden ser los primordios de los testes, aunque se encuentran en una región más externa a la esperada. Podrían deberse a poros excretores originados en la reproducción asexual (ver Panel B, indicado con flechas), similar a lo observado para gusanos sin segmentar (Figura 44). Otra opción, que debería ser confirmada es que estas estructuras correspondan al sistema nervioso. En el panel T de la Figura 45 se muestra la tinción del sistema nervioso de un organismo segmentado (Kemmerling et al., 2006). El patrón de tinción es similar al observado en este trabajo.

Se observa también señal en la región del macizo apical, en este caso con mayor extensión que la observada para gusanos sin segmentar (Figura 45, paneles D, E, I y J). Nótese la señal en la región de formación del surco apical en un organismo que comenzó un ciclo de reproducción asexual con cuatro ventosas (Panel I).

Estos patrones de detección tan poco uniformes puede indicar la localización de dos o más genes conservados que presenten hibridación cruzada (ver punto 3.3 de “Resultados y Discusión”). Sería conveniente diseñar sondas complementarias a la región 3’ de los genes, donde se observa una menor conservación (ver Figura 22, Sección “Resultados y Discusión”).

### **3.2. Análisis temporo – espacial de la proteína McCRISP2**

#### *3.2.1. Análisis de la expresión temporal mediante Western blot*

Para analizar el perfil de expresión del gen *McCRISP2* a nivel proteico durante el desarrollo estrobilar, se realizó un *Western blot* utilizando el suero anti-McCRISP2 revelado con una detección colorimétrica (reactivo AEC, *Sigma – Aldrich*). Los resultados, que se muestran en la Figura 46, indican que este tipo de detección no tiene la sensibilidad necesaria, ya que se

observan bandas muy tenues. De todas maneras, permite verificar que la proteína presuntamente se expresa en todas los estadios analizados del desarrollo estrobilar. El suero preinmune reconoce débilmente algunas bandas en los extractos, pero ninguna aparenta tener el tamaño de McCRISP2. Se indica con una flecha la banda que debido a su tamaño se cree que corresponde a McCRISP2. El tamaño observado es mayor que el tamaño calculado (aproximadamente 25kDa), lo que puede deberse a la presencia de modificaciones post-traduccionales que no son consideradas al calcular el peso molecular.

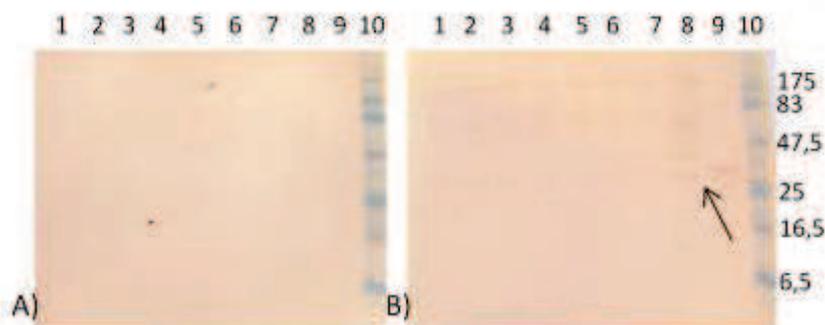


Figura 46: **Western blot** sobre extractos proteicos de *M. corti* en distintos estadios del desarrollo estrobilar. **A)** Incubación con suero preinmune diluido 1/1000. **B)** Incubación con suero anti-McCRISP2 diluido 1/1000. En ambos casos se reveló mediante incubación con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1/5000 (*Sigma – Aldrich*) y detección colorimétrica (reactivo AEC, *Sigma – Aldrich*). **1:** 2 días de cultivo, **2:** 4 días de cultivo sin Taurocolato de sodio (TC), **3:** 4 días de cultivo con TC, **4:** 7 días de cultivo sin TC, **5:** 7 días de cultivo con TC, **6:** 9 días de cultivo sin TC, **7:** 9 días de cultivo con TC, **8:** Mezcla de extractos de todos los días, **9:** Control positivo, Fracción insoluble de expresión en *E. coli*. **10:** Marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*)

Con el objetivo de normalizar la cantidad de proteína total cargada en los geles se realizó un *Western blot* con anticuerpo monoclonal anti-tubulina, asumiendo que esta proteína presenta expresión constitutiva. Previamente se testeó que el anticuerpo reconociera la proteína tubulina de *M. corti* ya que no fue diseñado específicamente para este organismo. El resultado fue el reconocimiento de una única banda de aproximadamente 60kDa (no se muestra). En la Figura 47 (panel A) se muestra el resultado del *Western blot* realizado con ambos anticuerpos en simultáneo (anti-tubulina monoclonal y suero anti-McCRISP2). Se realizó además un análisis densitométrico de las bandas de interés (Figura 47, paneles B y C).

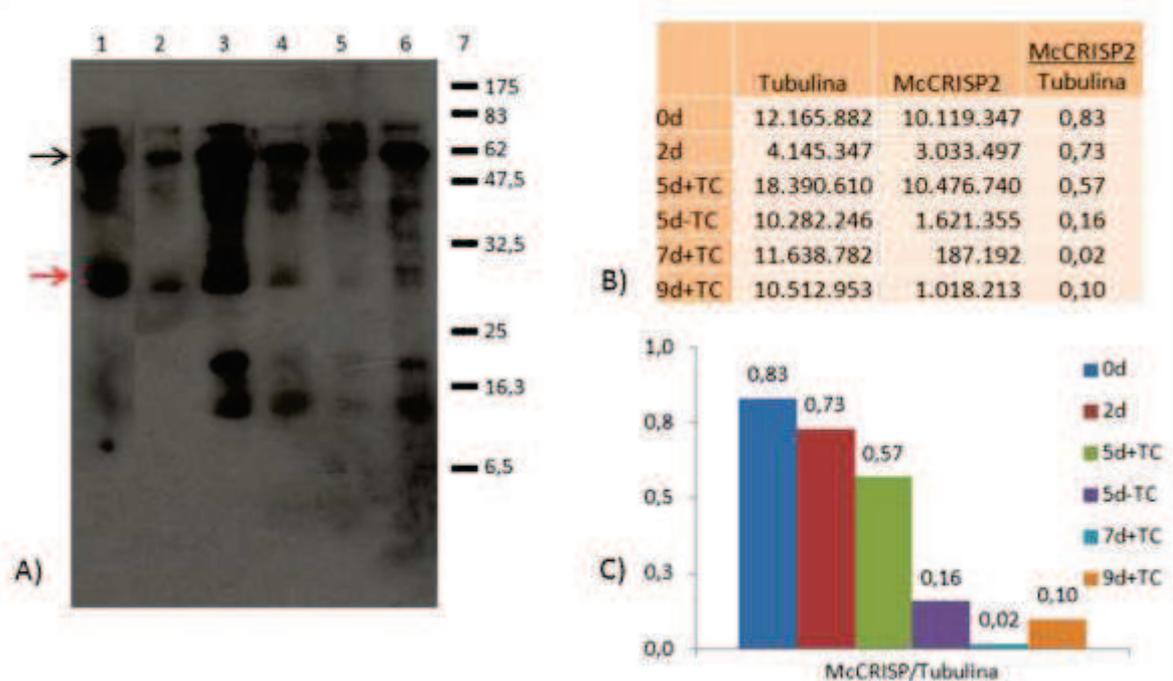


Figura 47: **Control de normalización de cantidad proteína en extractos proteicos de *M. corti* en distintos estadios de desarrollo.** Se incubó con anticuerpo monoclonal anti-tubulina producido en ratón (*Amersham*, diluido 1/5000) junto a suero anti-McCRISP2 diluido 1/1000. Se reveló con una mezcla de anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo (*Sigma – Aldrich*) diluido 1/5000 y anti-IgG de ratón (*DAKO*) diluido 1/4000 conjugados a peroxidasa seguido de detección quimioluminiscente (reactivo CPS3, *Sigma – Aldrich*). 1: 0 días de cultivo, 2: 2 días de cultivo, 3: 5 días de cultivo con TC, 4: 5 días de cultivo sin TC, 5: 7 días de cultivo con TC, 6: 9 días de cultivo con TC. 7: Esquema del Marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*). Se muestra con una flecha negra la banda correspondiente a tubulina, y con una roja la banda esperada para McCRISP2 de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente. B) Análisis densitométrico de las bandas señaladas con flechas en A. Los valores de la intensidad de las bandas tubulina y McCRISP2 están en unidades arbitrarias de intensidad, calculadas mediante el programa *ImageJ*. En la columna *McCRISP2/Tubulina* se muestra la cantidad de McCRISP2 normalizada a la cantidad de tubulina en cada carril. C) Representación gráfica de los niveles de proteína McCRISP2 normalizada a la cantidad de tubulina en cada carril.

En esta imagen se muestra que si bien los extractos fueron cuantificados (método del ácido bicinonínico) y se cargaron en todos los carriles 3µg de proteína total, la cantidad de tubulina no es uniforme en los distintos pocillos. Esto puede deberse a que la tubulina no se expresa con el mismo nivel durante el desarrollo o que el método de cuantificación no es eficiente. Otra opción es que haya habido errores en la siembra del gel. Lo ideal sería disponer de un anticuerpo anti-GAPDH, ya que se ha probado que éste gen se expresa constitutivamente en las condiciones ensayadas (al menos a nivel de ARNm, como se muestra en el punto 3.1.1 de ésta sección). También podría haberse utilizado un suero anti-TPM1 disponible en nuestro laboratorio.

Asumiendo expresión constitutiva de la tubulina, se realizó un análisis cuantitativo de la intensidad de las bandas (Figura 46, paneles B y C). Se observa una disminución en la expresión de la proteína entre 25 y 32.5kDa reconocidas por el suero anti-McCRISP2 a lo largo del desarrollo estrobilar. Este resultado es consistente con la cuantificación del ARNm realizada en este trabajo, pero para confirmar este resultado es necesario realizar réplicas del ensayo y

utilizar otro anticuerpo para normalizar la cantidad de proteína cargada en el gel

Lo que no se observa a nivel proteico es la alta expresión de McCRISP2 en organismos estresados (0 días de cultivo, carril 1). Esto sí se observó para el ARNm en los ensayos descritos en el punto 3.1 de esta sección. Si bien el ensayo de Western blot presentado es preliminar, esta diferencia en el nivel de expresión entre el ARNm y la proteína puede deberse a un mecanismo de regulación post-transcripcional de este gen.

Se decidió ensayar nuevamente la expresión, incluyendo en este caso una alícuota del medio de cultivo del parásito, para estudiar los productos de excreción/secreción. Esto permitiría verificar si alguna proteína secretada por el parásito es reconocida por el antisuero. En este caso se realizó un control positivo con anticuerpo anti-TPM para verificar el éxito de la técnica y para validar la cuantificación de los extractos, ya que se probó que a nivel de ARN mensajero el nivel se mantiene constante durante el desarrollo estrobilar. En la Figura 48 se muestran los resultados obtenidos.

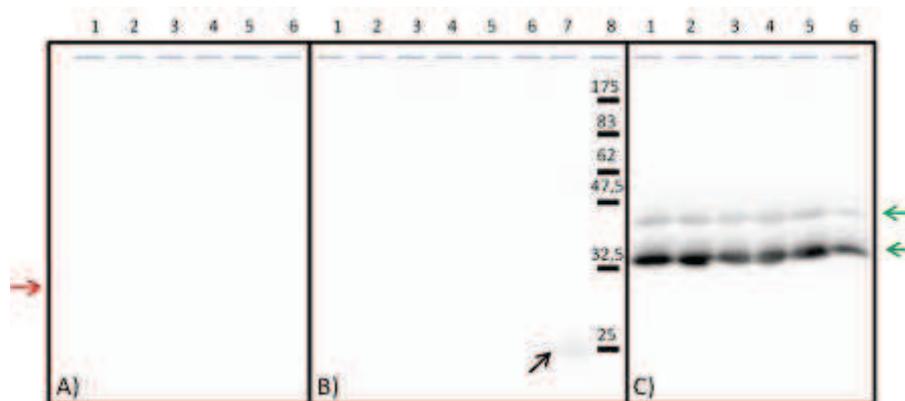


Figura 48: **Western blot sobre extractos proteicos y medio de cultivo de *M. corti* en distintos estadios del desarrollo estrobilar.** Revelado mediante incubación con anticuerpo primario (según detalle de cada panel) y con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*Sigma – Aldrich*) diluido 1/5000 seguido de detección quimioluminiscente (reactivo CPS3, *Sigma – Aldrich*). **A)** Medio de cultivo de *M. corti* (24µg de proteínas totales) revelado con suero anti-McCRISP2 diluido 1/500. **B)** Extractos proteicos de *M. corti* (15µg de proteínas totales) revelado con suero anti-McCRISP2 diluido 1/500. **C)** Extractos proteicos de *M. corti* (15µg de proteínas totales) revelado con suero anti-TPM diluido 1/1000. En A, B y C: **1:** 3 días de cultivo, **2:** 5 días de cultivo con TC, **3:** 7 días de cultivo con TC, **4:** 9 días de cultivo con TC, **5:** 11 días de cultivo con TC, **6:** 13 días de cultivo con TC. En B: **7:** Control positivo, extracto Fracción Insoluble de expresión en *E. coli*. **8:** Esquema del Marcador de peso molecular (*Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa), New England Biolabs, #P7708S*). Se muestra con líneas azules la posición de los pocillos, con una flecha negra, el control positivo, con flechas verdes las bandas correspondientes a las dos isoformas de McTPM1 (HMW y LMW) y con una flecha roja, el tamaño de la banda esperada para McCRISP2 de acuerdo a resultados anteriores.

El suero anti-McCRISP2 almacenado a -20°C desde el momento de su obtención, dejó de reconocer cualquier proteína presente en el extracto. Se evidencia la disminución en la reactividad del suero por la presencia de una banda tenue para el control positivo (carril 7, panel B, marcado con flecha) que anteriormente daba una banda intensa y definida (ver punto 2.1.2 de esta sección, Figura 29). La cantidad de proteína cargada en este caso fue mayor que en

los ensayos realizados al inicio de este trabajo (Figura 46) y se usó una dilución menor del antisuero. El resultado negativo no se debe a un problema de la técnica, ya que la membrana revelada con suero anti-TPM1 dio como se esperaba (panel C). La transferencia se realizó en conjunto para todas las muestras a partir de un mismo gel, con el corte de la membrana previo a la incubación con los distintos antisueros. Se repitió este ensayo con otras alícuotas de antisuero, pero el resultado siguió siendo negativo.

Debido a que no fue posible seguir trabajando con este antisuero, queda pendiente la caracterización precisa de la expresión de la proteína McCRISP2. Si se lograra optimizar la expresión de proteína soluble en medio acuoso, ya sea directamente mediante su producción en bacterias o levaduras, o mediante el plegamiento *in vitro*, sería ideal producir otro anticuerpo para continuar estudiando el perfil de expresión.

### 3.2.2. Análisis de la expresión espacial de la proteína McCRISP2

Para el análisis de la expresión espacial de la proteína McCRISP2 se intentaron dos estrategias: inmunohistoquímica sobre cortes o sobre organismos enteros (*in toto*). Se utilizó el suero anti-McCRISP2 y la fracción de inmunoglobulinas del mismo (IgGs). En la Figura 49 se muestran los resultados de la inmunohistoquímica realizada sobre cortes de parafina (A - D y O - P) o criocortes (E - N). Estos cortes se realizaron a partir de gusanos alargados sin principio de segmentación (5 días de cultivo).

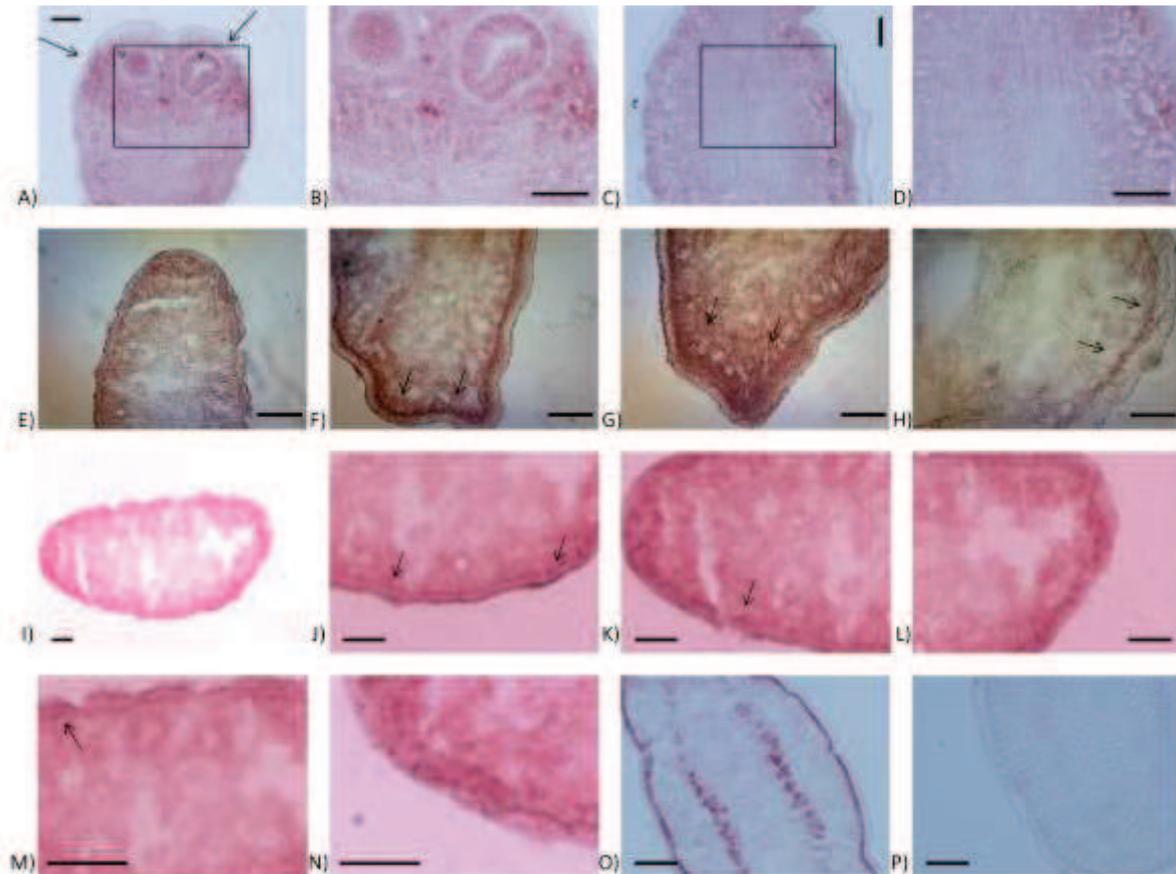


Figura 49: **Inmunohistoquímica sobre cortes de *M. corti* con 5 días de cultivo.** En todos los casos se reveló mediante incubación con anticuerpo primario (según lo detallado para cada imagen) e incubación en anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1/1000. Se realizó la detección con el reactivo AEC (*Sigma – Aldrich*). **A) a D)** Cortes de parafina. Suero anti-McCRISP2 diluido 1/500. Se muestra en A y B la región del escólex y el C y D una región posterior al escólex. Los recuadros en A y C indican la región ampliada en B y D respectivamente. Se puede observar una mayor señal en la parte anterior del escólex (A y B) y en la región subtegumentaria del cuerpo (C y D). **E) a N)** Criocortes. Suero anti-McCRISP2 diluido 1/500 (E) o 1/250(F), o inmunoglobulinas purificadas en dilución 1/500 (G, I a N) o 1/250 (H). En todos los casos se observa señal en la región subtegumentaria (marcado con flecha en J, K y M). **O) y P)** Controles de la técnica realizados en cortes de parafina: O) Control positivo con suero anti-TPM1 diluido 1/500 y P) Control negativo con suero preinmune (diluido 1/500). Se observa la ausencia de señal en el control negativo y la presencia de señal en el control positivo en la región subtegumentaria correspondiente a la musculatura subtegumentaria y en la región media correspondiente a la musculatura lisa interna. Las barras representan en todos los casos 50μm.

Se observa una señal para McCRISP2 que es mayor en la región subtegumentaria (paneles C a N). Esto concuerda con la hipótesis de que sea una proteína presuntamente secretada. Es en la región subtegumentaria que se encuentran las células secretoras, siendo parte del sincitio subtegumentario. En esta región se observa también la presencia del control positivo (TPM1). En la Figura 43 (paneles G a I) se muestra un esquema de la anatomía del tetratiridio y de la región subtegumentaria. Inmediatamente por debajo del tegumento se encuentran las fibras musculares externas, y más interiormente los cuerpos celulares del citoplasma sincitial subtegumentario. La capa muscular externa se encuentra interrumpida por puentes citoplasmáticos (cb) que comunican los cuerpos celulares (pt) con el citoplasma subtegumentario (sc). Si la proteína es producida por células ubicadas en esta región, es esperable observar una señal parcialmente superpuesta a la capa muscular externa. Para

confirmar esto sería deseable realizar la co-localización de TPM1 y McCRISP2 mediante inmunohistoquímica, pero ambos antisueros disponibles fueron producidos en conejo, y no disponemos herramientas para diferenciarlos en este momento. Se debería conjugar cada uno a fluoróforos distintos y analizar la localización por inmunofluorescencia. El nivel de resolución utilizado en este trabajo para la adquisición de las imágenes histológicas no permite observar si efectivamente co-localizan o si se encuentran en regiones muy adyacentes.

Para analizar si la proteína se expresa diferencialmente en las distintas regiones del cuerpo del organismo, es decir, si hay un gradiente de expresión a lo largo del cuerpo o si por el contrario la misma es uniforme a lo largo de todo el organismo, se realizó inmunohistoquímica sobre organismos enteros. En la Figura 50 se muestran los resultados obtenidos, donde puede observarse la expresión a lo largo de todo el cuerpo del organismo, localizada en puntos discretos. En el caso del control positivo (TPM1) también se observa una expresión en todo el cuerpo, pero no se visualizan puntos discretos. Esto es lo esperable para una proteína expresada en todas las células musculares que forman una capa de células por debajo del tegumento. En el caso de McCRISP2, los resultados muestran que no todas las células subtegumentarias estarían expresando la proteína, sino un subconjunto de ellas. Si ésta proteína es secretada al medio de cultivo, debería ser sintetizada por células secretorias subtegumentarias, las cuales no es de esperar que formen una capa continua (como sí ocurre en el sistema muscular) sino que se espera que estén dispersas en la región subtegumentaria, separadas unas de otras.

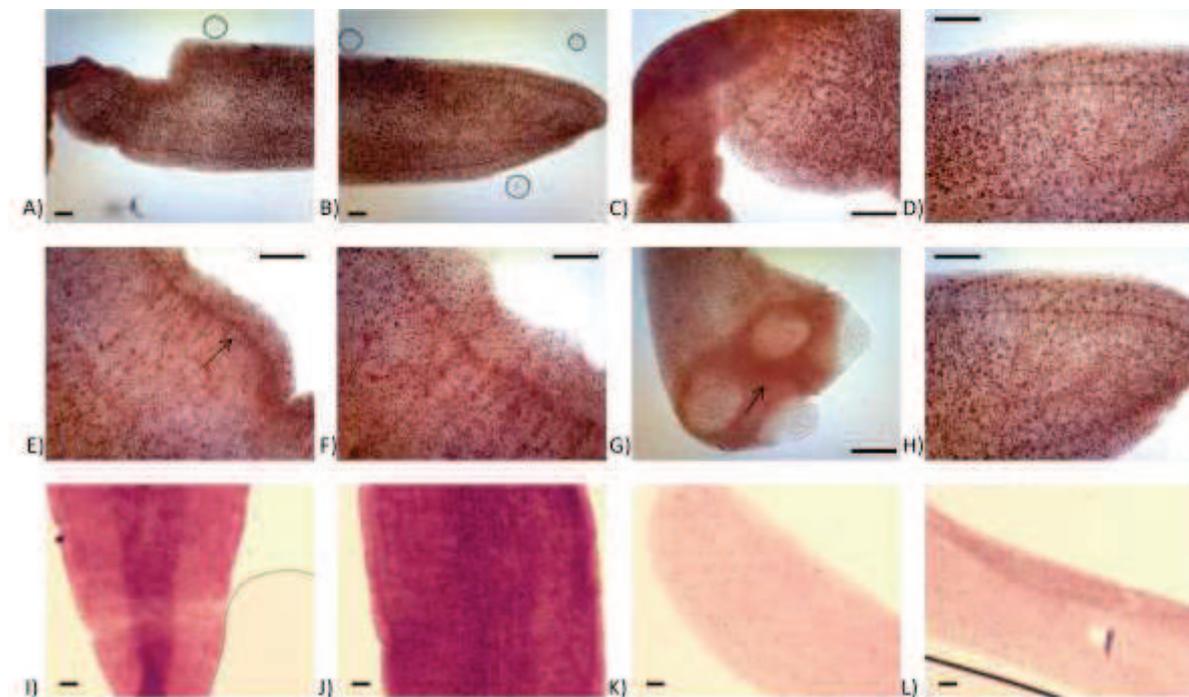


Figura 50: **Inmunohistoquímica sobre organismos enteros mantenidos en cultivo durante 7 días.** En todos los casos se reveló mediante incubación con anticuerpo primario (según lo detallado para cada imagen) seguido de incubación en anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido 1/500 y detección con el reactivo AEC (Sigma – Aldrich) **A a H)** Suero anti-McCRISP2 diluido 1/500. **I) y J)** Suero anti-TPM diluido 1/500. **K) y L)** Suero preinmune diluido 1/500. Las barras representan 100µm en A, B, I a H y 50µm en C a H.

Se observa una señal más intensa (Figura 50, señalada con flecha en el panel E), que debido a la anatomía del organismo, no puede distinguirse si se trata del sistema excretor, nervioso o muscular, ya que éstos pueden confundirse debido a su cercanía. Es de vital importancia contar con marcadores o anticuerpos para cada uno de estos sistemas que permitan realizar co-localización con las proteínas de interés para poder determinar finamente cuál es su sitio de expresión. En cuanto al sistema muscular, contamos con un suero anti-TPM1, utilizado en este trabajo como control positivo de las técnicas, que permite evidenciar la localización del sistema muscular. Actualmente contamos con una mejor descripción del sistema nervioso de *M. corti* y disponemos de anticuerpos que permiten determinar su localización (Koziol, comunicación personal) que nos permitirán comparar los patrones de expresión.

No necesariamente por ser una proteína presuntamente secretada, al poseer un péptido señal de secreción, esta debe liberarse al medio circundante. La hipótesis de secreción al medio de cultivo era una alternativa tentadora debido a reportes en otros organismos, principalmente nematodos. Sin embargo, los estudios proteómicos en platelmintos de los productos de excreción/secreción o de distintos estadios de desarrollo no revelan la presencia de proteínas pertenecientes a la superfamilia SCP/TAPS como las más abundantes (Cui et al., 2013; Laschuk et al., 2011; Virginio et al., 2012). Esto se puede deber a que efectivamente no se expresen en gran abundancia como ocurre en nematodos, o a que no hayan podido ser identificadas.

### 3.3. Resumen de resultados y Discusión general

Para el análisis de la expresión temporal del gen *McCRISP2* se eligieron las técnicas de RT – qPCR y *Western blot* para determinar si existen variaciones a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti*. Para el análisis espacial de la expresión se utilizaron técnicas histológicas de inmunodetección e hibridación *in situ* e *in toto*.

Para la determinación de los niveles de expresión del ARNm, los resultados obtenidos y presentados en este capítulo son muy alentadores. Se determinó que las condiciones para la extracción del ARN y posterior retrotranscripción son adecuadas. Además, se verificó que los genes TPM1, GAPDH y 18S no presentan variaciones en los niveles de expresión durante el desarrollo estrobilar. Para uno de ellos, TPM1, habíamos reportado que no hay variación apreciable en los niveles de expresión de la proteína a lo largo del desarrollo (Koziol et al., 2011). En este trabajo se verificó que a nivel de ARNm tampoco existen cambios significativos en la expresión. Estos resultados nos permitirán además analizar los niveles de expresión de otros genes vinculados a la proliferación que investiga nuestro grupo de trabajo.

Para que lo observado para el ARN mensajero *McCRISP2* sea más confiable, es necesario realizar ensayos con réplicas biológicas, para verificar que esta tendencia se mantiene con significancia estadística. Además, es necesario realizar el cálculo formal de la eficiencia de las reacciones de PCR para validar los cálculos realizados.

Con los resultados preliminares obtenidos, se observa una disminución del nivel de la expresión del ARN mensajero *McCRISP2* a lo largo del desarrollo estrobilar. Estos resultados no son consistentes con los obtenidos por Britos et al. (2007) , ya que en ese trabajo se había determinado que el número de copias de *McCRISP2* en gusanos segmentados era mayor que en tetratiridios, contrario a lo obtenido en el presente trabajo. La realización de nuevas réplicas permitirá confirmar o rechazar el resultado aquí obtenido. Es importante destacar que los cebadores para qPCR utilizados en este trabajo difieren de los utilizados en el trabajo anterior.

Además, debido a que es una familia multigénica, es necesario confirmar que los productos de amplificación obtenidos correspondan al transcripto de interés. El hecho de que al clonar y secuenciar los productos de PCR obtenidos de la reacción, todos los clones analizados correspondieran a *McCRISP2* asegura que la cuantificación obtenida se refiere a este gen y no a otros transcriptos pertenecientes a la superfamilia.

Es importante destacar la similitud entre *McCRISP2* y *McCRISP4*, las cuales presentan una conservación a nivel nucleotídico del 80%. En la Figura 51 se muestra el alineamiento de las secuencias de estos transcriptos y se indica la posición de los cebadores que se utilizaron en este trabajo y en el de Britos et al. (2007).

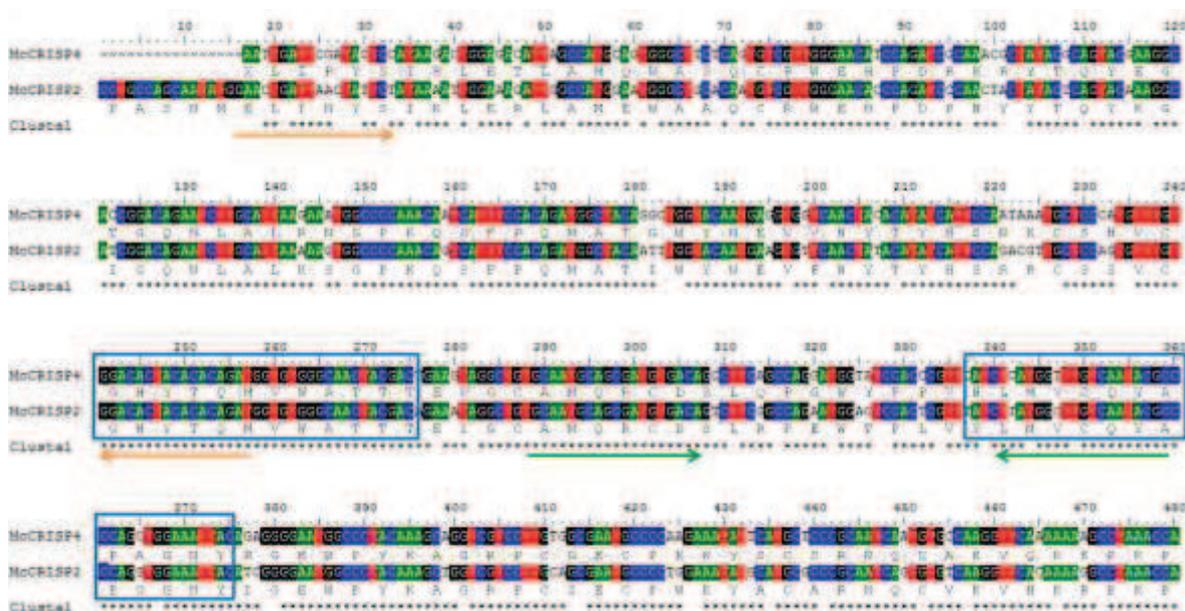


Figura 51: **Alineamiento de *McCRISP2* y *McCRISP4* a nivel nucleotídico.** La secuencia de *McCRISP2* es parcial, a partir del motivo PPSANM. La secuencia de *McCRISP4* corresponde a la región conocida. Los residuos nucleotídicos conservados se muestran coloreados. Debajo de cada secuencia de ADNc se indica la secuencia traducida. La X al principio de la secuencia proteica de *McCRISP4* indica un aminoácido desconocido. Con recuadros azules se señalan los motivos CRISP1 y CRISP2 característicos de la superfamilia, altamente conservados a nivel aminoacídico. Con flechas anaranjadas se muestran los cebadores utilizados para la cuantificación de ARNm por Britos et al. (2007) y con flechas verdes los utilizados en este trabajo.

A partir del alineamiento de éstos genes, se deduce que en ambos trabajos, uno de los cebadores hibrida en una región totalmente conservada (reverso utilizado previamente y directo de este trabajo). El otro cebador hibrida en una región con menor conservación. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de reacción utilizadas, estos cebadores podrían amplificar ambos transcriptos. El hecho de que en este trabajo se hayan clonado y secuenciado los productos de amplificación confirma que en las condiciones ensayadas no se amplifica *McCRISP4*, siendo en principio específica para *McCRISP2* según los genes conocidos hasta el momento pertenecientes a la superfamilia. Esto no fue realizado por Britos et al. (2007), y debido a la similitud de las secuencias es esperable obtener un único pico en la curva de

desnaturalización, a pesar de amplificar un producto inespecífico. La probabilidad de que anteriormente se haya amplificado el transcripto *McCRISP4* implicaría que en este parásito existen dos secuencias altamente conservadas que presentan expresión estadio específicos. Esta hipótesis debe ser probada, por ejemplo utilizando cebadores específicos para *McCRISP4* en RT-qPCR como se realizó para *McCRISP2*. Para asegurarnos de amplificar únicamente *McCRISP2* o *McCRISP4* convendría diseñar cebadores que amplifiquen un producto de mayor tamaño, de modo que al secuenciarlo se pueda confirmar su identidad inequívocamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos de *Western blot* no son tan concluyentes ya que el suero anti-*McCRISP2* reconoce varias proteínas presentes en los extractos proteicos de *M. corti*. Este reconocimiento puede deberse a que haya habido alguna proteína contaminante en la preparación del antígeno para la generación del antisuero, y ésta sea homóloga a alguna proteína de *M. corti*, o a que el antisuero reconozca otras proteínas del parásito pertenecientes a la superfamilia. Se debería además haber testado otras diluciones del antisuero en los ensayos de *Western blot* para determinar si la concentración del mismo era adecuada.

Para verificar qué proteínas de *M. corti* son reconocidas por el suero anti-*McCRISP2*, y determinar la especificidad de los resultados obtenidos, se debería realizar una electroforesis de proteínas bidimensional seguida de un *Western blot* con este antisuero. Al recortar los *spots* del gel reconocidos por el mismo se puede determinar su identidad mediante mapeo peptídico por espectrometría de masas. Debido a que no existen datos a nivel genómico o transcriptómico al momento de *M. corti* puede haber *spots* que correspondan a proteínas que permanezcan sin identificar. El aislamiento de nuevos genes con dominio SCP/TAPS descrito en el punto 1.2 de la sección “Resultados y Discusión” permitiría determinar si alguna proteína reconocida corresponde a alguno de estos genes. Esta estrategia fue realizada exitosamente por nuestro grupo para la proteína TPM1 (Koziol et al., 2011).

Debido a la inestabilidad del antisuero obtenido no se pudo realizar este ensayo mencionado ni determinar si alguna proteína secretada por el parásito al medio de cultivo es reconocida por el antisuero. Esto sería de interés para comprobar los resultados obtenidos en los ensayos histológicos (ver más adelante).

Con respecto a la localización de la expresión en el organismo, se observan dos perfiles diferentes según las técnicas utilizadas, posiblemente debido a hibridaciones cruzadas con otros genes. En el análisis de cortes, tanto a nivel de ARN como de proteínas, se observa expresión en la región subtegumentaria lo que es consistente con la hipótesis de secreción al medio de cultivo propuesta para esta proteína ya que en esa región se encuentran las células secretorias subtegumentarias. Algo similar se observa en los inmunoensayos sobre organismos enteros. En cambio, para el análisis de la expresión del ARNm en organismos enteros, el perfil de expresión es más variable, incluso entre distintos estadios de desarrollo. En este caso, la localización no es concluyente. Debemos confirmar estos resultados preliminares mediante co-localización de marcadores específicos de cada tejido para asegurarnos en qué sistema del organismo se expresan estos genes. En particular, contamos con marcadores del sistema nervioso y del sistema muscular. Debido a que los antisueros disponibles fueron producidos en conejo, podría intentarse realizar una co-localización de ARNm para un gen y de proteína para el otro. Esta sería una buena aproximación a la co-localización en estas condiciones. Otra opción sería

conjugar uno de los anticuerpos primarios a una molécula reportera que pueda detectarse directamente.

Es de destacar la señal positiva en la región anterior del escólex, tanto en los ensayos realizados en cortes (Figura 43 y Figura 49) o en organismos enteros (Figura 44 y Figura 50). En esa región se encuentra el macizo apical descrito por Hess (1980) cuyas células presentan las características de células secretorias. Thompson, et al. (1979), reportaron para *E. granulosus* la secreción de proteínas ricas en cisteína por glándulas secretorias asociadas al róstelo cuando el parásito adulto se encuentra adherido al intestino de perros (determinado por análisis químicos del material liberado hacia las criptas del intestino). Si bien ese ensayo no permite determinar la identidad de las proteínas, los resultados aquí presentados nos permiten plantear la hipótesis de que podría tratarse de McCRISP2 u otra proteína de la superfamilia. Comprobar esto sería complicado desde el punto de los protocolos de experimentación animal, dado que los ensayos realizados por Thompson, et al. (1979) implican perros infectados con *E. granulosus*, que deben ser sacrificados una vez aislados los intestinos con los parásitos adheridos. Además, las oncósferas liberadas por el estadio adulto son nocivas para el ser humano, por lo que es necesario tener instalaciones de seguridad que eviten el riesgo de contaminación a los operarios.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Britos (2007) para la expresión de ARN mensajero en la región del macizo apical del tetratiridio. En este trabajo además se obtuvo señal en esta región en gusanos segmentados.

A nivel de los proglótides de gusanos adultos, los trabajos no son concordantes. Anteriormente se reportó la localización de señal para *McCRISP2* en los órganos reproductivos, siendo detectada la señal en el centro del proglótide donde se encuentran los rudimentos del aparato reproductor femenino. En este trabajo la señal obtenida, si estuviera asociada al sistema reproductor, no se encuentra a nivel del aparato femenino, sino a nivel de los testes. Esta localización sería más concordante con la literatura, en la que se asocia a proteínas de la familia CRISP al aparato reproductor masculino (Gibbs et al., 2008). Las sondas utilizadas en ambos trabajos son similares, abarcando la totalidad de la región codificante. Las diferencias observadas pueden deberse al reconocimiento de más de un transcripto perteneciente a la superfamilia expresados en diferentes estadios de desarrollo. En particular, Britos, et al. (2007) analizaron estadios de desarrollo más avanzados, los cuales no fueron alcanzados en este trabajo.

conclusiones y perspectivas

### Conclusiones

En este trabajo se aportó al conocimiento de proteínas pertenecientes a la superfamilia SCP/TAPS del cestodo *M. corti*. En particular, identificando nuevos genes pertenecientes a la superfamilia y determinando los perfiles de expresión de un miembro de la superfamilia, McCRISP2.

Una conclusión general que se puede realizar es la necesidad de conocer todos los genes pertenecientes a la superfamilia y realizar controles adecuados en los experimentos en que se analiza la expresión de este tipo de genes. Evidenciar reacciones cruzadas es de vital importancia para caracterizar a los distintos miembros. Debido a la diversidad que presenta la superfamilia, es de esperar que estas proteínas tengan funciones que impliquen un mecanismo conservado otorgado por su plegamiento característico, pero cada una con un rol específico en un determinado momento y condición de la biología del parásito. La variedad de funciones reportadas para los distintos miembros, al menos en mamíferos, indica que es necesario estudiar cada proteína independientemente y no como un grupo.

En este sentido, la estrategia de aislamiento de nuevos genes utilizando un cebador degenerado, combinado con una estrategia de RACE 3' fue ampliamente exitosa. Se aislaron seis nuevos transcritos, además de los cuatro conocidos previamente.

Con respecto a la producción de proteínas recombinantes solubles, se debe resaltar la dificultad que presentan estas proteínas para su expresión heteróloga. El sistema de expresión eucariota *P. pastoris* parecía *a priori* prometedor, ya que se ha reportado que este sistema presenta los requerimientos necesarios para la producción de este tipo de proteínas. En la práctica los resultados obtenidos no son alentadores, al menos con la estrategia elegida. Intentar con otra levadura (*Hansenula polymorfa*) o diferentes estrategias de secreción son puntos a tener en cuenta. La estrategia más prometedora de las ensayadas en este trabajo es la producción de la proteína en forma insoluble en *E. coli* y posterior plegamiento a partir de los cuerpos de inclusión.

En cuanto a la caracterización del perfil de expresión de McCRISP2, los resultados son preliminares. Los perfiles de expresión espaciales son distintos dependiendo del estadio que se estudia, lo que podría deberse a la heterogeneidad de los cultivos *in vitro*. En las hibridaciones *in situ*, la alta homología de los genes pertenecientes a la superfamilia no permite descartar la aparición de reacciones cruzadas con otros miembros de la superfamilia. Esta puede ser una razón de la disparidad de resultados dependiente del estadio estudiado.

El resultado que es más confiable, en cuanto a que se confirmó que se está midiendo el ARN mensajero *McCRISP2*, es la cuantificación de la expresión temporal a nivel de ARNm a lo largo del desarrollo. La optimización de las condiciones de reacción de PCR cuantitativo nos permitió determinar una disminución en la cantidad de ARN mensajero a lo largo del desarrollo estrobilar. Este trabajo, permitirá además analizar la expresión de otros genes de interés en este organismo. Este resultado, es confirmado por los estudios preliminares a nivel de proteína, en que también se observa una disminución.

### Perspectivas

Rastrear un mayor número de clones obtenidos a partir de la estrategia de PCR con cebadores degenerados para aislar nuevos transcritos. Existen proyectos en marcha en los que se prevé realizar la secuenciación del genoma de *M. corti* (Instituto Sanger, nuestro grupo aportó el ADN genómico, no publicado) y del transcriptoma de distintos estadios (proyecto de nuestro grupo de trabajo y de otros colaboradores, comunicación personal). Estas estrategias pueden aportar al conocimiento de nuevos genes.

Analizar más a fondo las secuencias obtenidas, en busca de pautas que indiquen una explicación a la necesidad de tantas proteínas similares por parte de este parásito. En particular, analizar cómo se originan los genes McCRISP2 y McCRISP4 (duplicación reciente, polimorfismos, entre otros) y si presentan perfiles de expresión diferentes a lo largo del desarrollo estrobilar

Explorar las distintas alternativas planteadas en este trabajo para la producción de proteínas solubles. Disponer de proteína soluble permitirá producir un nuevo antisuero para culminar los estudios iniciados en este trabajo sobre el patrón de expresión de la proteína McCRISP2 a lo largo del desarrollo. Además, al disponer de proteína soluble se pueden seguir diferentes estrategias en busca de una posible función para la proteína McCRISP2. Pueden realizarse ensayos de unión a otras proteínas o inmunoprecipitación con el suero anti-McCRISP2 para determinar si alguna macromolécula interacciona con McCRISP2, ensayos de unión a lípidos (según lo reportado por Xu et al. (2012) para la proteína Tablysin 15 del insecto *Tabanus yao* perteneciente a la superfamilia). Otra alternativa que permitiría verificar la hipótesis de secreción de McCRISP2 al exterior del parásito sería la obtención de suero de ratones infectados con *M. corti* para analizar la presencia inmunoglobulinas que la reconozcan. Esto indicaría si esta proteína está implicada en la interacción del parásito con su hospedero.

Purificar McCRISP2 nativa mediante una combinación de métodos cromatográficos para caracterizarla bioquímicamente. Para ello es necesario contar con una herramienta que permita seguir la purificación. Debido a que no hay una función reportada para esta proteína es indispensable disponer de un anticuerpo específico bien caracterizado que la reconozca. Tal vez una alternativa para obtener un anticuerpo específico para McCRISP2 sea mediante la generación de anticuerpos monoclonales.

En cuanto a la caracterización de los patrones de expresión espacial es necesario realizar co-localizaciones con distintos marcadores que permitan identificar finamente en qué tejidos se expresa McCRISP2. Como se mencionó, contamos con marcadores de sistema nervioso y muscular. Habría que estudiar las posibilidades para realizar una doble tinción de hibridación *in situ* con inmunolocalización, por ejemplo, para poder distinguir entre las señales obtenidas.

Determinar la especificidad del reconocimiento del anticuerpo y de la sonda diseñada para los estudios de localización de la expresión de McCRISP2. Esto permitirá determinar si se está estudiando uno o varios genes pertenecientes a la superfamilia. En el caso del anticuerpo, como se menciono, puede determinarse su especificidad mediante inmunoblot de geles bidimensionales e identificación de los *spots* reconocidos mediante espectrometría de masa. En el caso e la sonda diseñada para hibridación *in situ* e *in toto*, se podría realizar un *Northern blot* sobre transcritos sintetizados a partir de plásmidos conteniendo cada gen conocido de la superfamilia.

apéndices

## 1. Soluciones

### 1.1. *Cultivo de Mesocestoides corti*

- a. **Hanks:** 9.8g/l sales de Hanks (*Sigma - Aldrich*, catálogo número H6136, Lote 087K83012), 350mg/l NaHCO<sub>3</sub> (Fluka). Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por filtración.
- b. **Medio RPMI 1640 modificado:** 10.4g/l RPMI (*Sigma - Aldrich*, catálogo número R4130, Lote 049K8307), 4.2g/l NaHCO<sub>3</sub> (Fluka), 4.3g/l Glucosa (*Sigma - Aldrich*), 4.8g/l extracto de levadura (*Sigma - Aldrich*). Se ajustó el pH a 7.5, se agregó gentamicina 50µg/ml concentración final y se esterilizó por filtración.

### 1.2. *Extracción de ARN y proteínas*

- a. **PBS (Buffer Fosfato salino):** 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó por autoclavado. En el caso de utilizarlo para extracción de ARN se utilizó PBS en tabletas (*Sigma - Aldrich*, catálogo número P4417) disueltas en agua DEPC (*Sigma - Aldrich*).
- b. **Buffer de Lisis:** 50mM Tris – HCl pH 8; 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF (*Sigma - Aldrich*).

### 1.3. *Preparación de material para estudios histológicos*

#### 1.3.1. *Hibridación in toto de ARN*

- a. **PBSTx:** PBS – 0.5% Triton-X100
- b. **Solución reductora:** 50mM DTT, 1% NP-40, 0.5% SDS en PBS

### 1.4. *Electroforesis*

#### 1.4.1. *Ácidos nucleicos*

- a. **Buffer TAE 1X:** 40mM Tris base, 20mM ácido acético, 1mM EDTA; pH 8.4.
- b. **Buffer de carga 6X:** 0.25% Azul de bromofenol, 0.25% Azul de xilencianol, 30% Glicerol

#### 1.4.2. *Proteínas*

- a. **Buffer de carga 4X:** 0.25M Tris – HCl pH 6.8, 40% Glicerol, 4% SDS, 4% 2-Mercaptoetanol, 0.02% Azul de bromofenol
- b. **Tinción con Coomassie Blue**
  - b.1. **Solución de Coomassie Blue:** 0.2% Coomassie Blue R-250, 30% Etanol, 7% Ácido acético
  - b.2. **Solución decolorante:** 30% Etanol, 7% Ácido acético
- c. **Tinción con nitrato de plata**
  - c.1. **Solución fijadora:** 40% Etanol, 10% ácido acético

**c.2. Solución de nitrato de plata:** 0.2g de nitrato de plata, 0.075% formaldehído

**c.3. Solución reveladora:** 0.3g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4mg/l tiosulfato de sodio, 0.05% formaldehído.

### 1.5. Western blot

- a. **Buffer de transferencia:** 25mM Tris base, 192mM Glicina, 20% etanol.
- b. **TBST:** 10mM Tris – HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20.
- c. **Buffer de bloqueo:** 5% leche descremada, 2% de glicina en TBST
- d. **Buffer Acetato 50mM pH5:** 14.8mM ácido acético, 35.2mM acetato de sodio

### 1.6. Plegamiento en columna

- a. **Buffer de lisis con lisozima:** 10mM Tris – HCl pH 8, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2% lisozima
- b. **Buffer con detergente:** 3% Igepal® CA-630 (*Sigma – Aldrich*) en 10mM Tris – HCl (pH 7.5), 1mM EDTA
- c. **Buffer con urea:** 50mM Tris – HCl (pH 8.0) 8M urea 0.5M NaCl, 20mM Imidazol y 10mM 2-mercaptoetanol.
- d. **Buffer de Binding:** 50mM Tris – HCl (pH 9.6) 8M urea 0.5M NaCl, 20mM Imidazol y 10mM 2-mercaptoetanol
- e. **Solución A:** 6M urea, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 50mM Tris – HCl (pH 9.6)
- f. **Solución B:** 1M urea, 0.5M NaCl, 10% glicerol, 2.5mM glutatión reducido, 0.5mM glutatión oxidado, 50mM Tris – HCl (pH 9.0)
- g. **Buffers de elución:**
  - g.1. 50mM Tris – HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 0.01% Triton X100.
  - g.2. 50mM Tris – HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol.
  - g.3. 50mM Tris – HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 8M Urea
  - g.4. 50mM Tris – HCl pH 9.6, 0.15mM NaCl, 250mM Imidazol, 1M Urea.

### 1.7. Expresión de la proteína recombinante McCRISP 2 en *Escherichia coli*

- a. **Medio LB (Luria – Bertani):** 1% Triptona, 0.5% Extracto de Levadura, 1% NaCl, pH 7.0
- b. **Buffer Extracción Periplasma:** 0.5M Sacarosa, 20mM Tris – HCl, pH8, 0.25mg/ml lisozima, 0.1M EDTA, 1mM PMSF.
- c. **Buffer de lisis:** 50mM Tris – HCl, pH 7.5, 5% Glicerol, 50mM NaCl
- d. **Buffer desnaturalizante:** 40mM Tris – HCl, pH 7.5, 8M Urea

### 1.8. Expresión de la proteína recombinante McCRISP 2 en *Pichia pastoris*.

- a. **Medios de cultivo:**
  - a.1. **YPD (Yeast Peptone Dextrose Medium):** 1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 2% Glucosa
  - a.2. **YPDS – Agar (Yeast Peptone Dextrose Sorbitol Medium):** 1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 2% Glucosa, 1M Sorbitol. 15g/l Agar
  - a.3. **BMGY (Buffered Glycerol-Complex Medium):** 1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 100mM Fosfato de Potasio pH 6.0, 1.34% YNB (*Yeast Nitrogen Base*), 4 x 10<sup>-5</sup>% Biotina, 1% Glicerol
  - a.4. **BMMY (Buffered Methanol-Complex Medium):** 1% Extracto de levadura, 2%

Peptona, 100mM Fosfato de Potasio pH 6.0, 1.34% YNB (*Yeast Nitrogen Base*),  $4 \times 10^{-5}$ % Biotina, 0.5% Metanol

**a.5. MDH (*Minimal Dextrose Medium + Histidine*):** 1.34% YNB (*Yeast Nitrogen Base*),  $4 \times 10^{-5}$ % Biotina,  $4 \times 10^{-3}$ % Histidina, 2% Glucosa

**a.6. MMH (*Minimal Methanol Medium + Histidine*):** 1.34% YNB (*Yeast Nitrogen Base*),  $4 \times 10^{-5}$ % Biotina,  $4 \times 10^{-3}$ % Histidina, 0.5% Metanol

### 1.9. Extracción de ADN genómico de levaduras

- a. **Buffer STES:** 0.2M Tris – HCl pH 7.6; 0.5M NaCl; 0.1% (w/v) SDS; 10mM EDTA
- b. **Buffer TE pH 7.6:** 10mM Tris –HCl pH 7.6; 1mM EDTA.

### 1.10. Procesamiento de alícuotas de expresión

- a. **Breaking Buffer:** 50mM Fosfato de sodio pH 7.4, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 5% glicerol

### 1.11. Cuantificación de sondas marcadas con Digoxigenina

- a. **Buffer 1:** 100mM Tris – HCl pH 7.5, 150mM NaCl.
- b. **Buffer 2:** 0.5% w/v agente de bloqueo (*Boehringer*) en *buffer 1*
- c. **Buffer 3:** 100mM Tris – HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>.
- d. **Buffer de revelado:** 330µg/ml NBT (*Amresco*), 167µg/ml BCIP (*Amresco*) en *Buffer 3*

### 1.12. Hibridación in situ sobre criocortes.

- a. **PBS:** 8g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.44g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclavado
- b. **PBSTx:** PBS – 0.5% Triton-X100
- c. **SSC 20X:** 3M NaCl, 0.3M citrato de sodio
- d. **Denhart 50X:** 1% Ficoll 400, 1% polyvinilpyrolidona, 1% BSA
- e. **Solución de prehibridación:** SSC 5X, 50% formamida desionizada, 10% sulfato de dextrano, 1mg/ml ARNt de levadura, 1X Denhardt
- f. **Solución 1:** SSC 1X, 50% formamida, 0,1% Tween-20
- g. **Solución 2:** SSC 1X - 50% formamida.
- h. **MAB:** 100mM ácido maleico, 150mM NaCl
- i. **Solución de bloqueo:** 0.5% reactivo de bloqueo (*Boehringer*), 1% BSA y 5% suero de oveja (*Sigma-Aldrich*) en *buffer MAB*
- j. **MABT:** MAB – 0.1% Tween-20
- k. **Buffer AP:** 100mM Tris – HCl pH 9.5, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl
- l. **Reactivo NBT//BCIP:** Ready to use tablets (*Roche*) disueltas en agua o 330µg/ml NBT (*Amresco*), 167µg/ml BCIP (*Amresco*) en *Buffer AP*
- m. **PBSTw:** PBS – 0.1% Tween-20

### 1.13. Hibridación in toto sobre organismos enteros

- a. **Solución reductora:** 50mM DTT, 1% NP-40, 0.5% SDS en PBS
- b. **PBSTx:** PBS – 0.5% Triton-X100
- c. **Proteinasa K:** 2µg/ml (*New England Biolabs*) en PBSTx con 0.1% SDS
- d. **Solución de prehibridación:** 50% Formamida, 5X SCC, 1mg/ml tRNA, 1% Tween-20
- e. **Solución de hibridación:** 1ng/µl de sonda desnatura en *buffer* de prehibridación complementado con 5% de sulfato de dextrano.

- f. **Solución de lavado 1:** Una parte de Solución de prehibridación con una parte de 2X SCC, 0.1% TritonX-100.
- g. **Solución de lavado 2:** 2X SCC, 0.1% TritonX-100
- h. **Solución de lavado 3:** 0.2X SCC, 0.1% TritonX-100
- i. **MABT:** 1X MAB, 0.1% Tween-20
- j. **Solución de bloqueo:** 5% Suero de caballo en MABT
- k. **Buffer AP:** 100mM Tris – HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>.
- l. **Reactivo NBT//BCIP:** Ready to use tablets (*Roche*) disueltas en agua o 330µg/ml NBT (*Amresco*), 167µg/ml BCIP (*Amresco*) en *Buffer AP*

#### 1.14. ***Inmunohistoquímica sobre cortes de parafina o criocortes***

- a. **Solución de bloqueo:** 1% BSA, 5% suero de oveja (*Sigma – Aldrich*), 0.05% Tween-20 en PBS

#### 1.15. ***Inmunohistoquímica sobre organismos enteros.***

- a. **PBSTx:** 0,1% Triton X-100 en PBS
- b. **PBSTw:** 0,05% Tween-20 PBS.
- c. **Solución de bloqueo:** 1% seroalbúmina bovina (BSA) y 5% suero de oveja (*Sigma-Aldrich*, número de catálogo S-3772) en PBSTw

## 2. Cebadores diseñados

Tabla 11: Cebadores diseñados para realizar 3' RACE

NOMBRE	SECUENCIA
McCR1_F (cebador directo externo)	5'-GATCCACCTGCCAGCAATATGC-3'
McCR1_Fn (cebador directo interno)	5'-GGCAAGAACCTGCTCATTTCAGC-3'
McCR1_R (cebador reverso control)	5'-TCTTGCCAGTCGTCAGCCAACCTTC-3'
McCR4_F (cebador directo externo)	5'-TGGGAACATCCAGATCGCAAACG-3'
McCR4_Fn (cebador directo interno)	5'-TCATTTCACAGATGGCTACAGG-3'
McCR4_R (cebador reverso control)	5'-GTTTACCGCTTCATTGTACCAACC-3'

Tabla 12: Cebadores diseñados para realizar 5' RACE

NOMBRE	SECUENCIA
McCR1_R (cebador reverso externo)	5'-TCTTGCCAGTCGTCAGCCAACCTTC-3'
McCR1_Rn (cebador reverso interno)	5'-CTGGCAGGTGGATCAACTCCTTCTC-3'
McCR1_F (cebador directo control)	5'-GATCCACCTGCCAGCAATATGC-3'
McCR3_R (cebador reverso externo)	5'-GGCAGAAGCAGCGGGAACCTTAAGC-3'
McCR3_Rn (cebador reverso interno)	5'-GACAAGAGGATCAGGGTGGTTATCTG-3'
McCR4_R (cebador reverso externo)	5'-GTTTACCGCTTCATTGTACCAACC-3'
McCR4_Rn (cebador reverso interno)	5'-GTGCCTTCGTACTGCGTATAGCGT-3'
McCR4_F (cebador directo control)	5'-TGGGAACATCCAGATCGCAAACG-3'

Tabla 13: Cebadores diseñados para el clonado de McCRISP2 en vectores de expresión.

Clonado en pET41a	Directo <sup>1</sup>	<b>ACTAGT</b> <u>CTGGTGCCACGCGGTAGT</u> CAAGTACCAACACGAGC
	Reverso <sup>2</sup> (Completa)	GGC <b>CTCGAG</b> GGGATGTGGTTTAGGCC
Clonado en pPICZαA	Directo <sup>3</sup>	CCG <b>GAATT</b> CCAAGTACCAACACGAGC
	Reverso <sup>4</sup>	ACG <b>CGTCGAC</b> GGGATGTGGTTTAGGCC
Subrayado: secuencia que codifica para el sitio de corte de trombina. Negrita: secuencias de las enzimas de restricción elegidas para el clonado direccional. 1: <i>SpeI</i> , 2: <i>XhoI</i> , 3: <i>EcoRI</i> , 4: <i>SalI</i>		

### **3. Reacciones de PCR**

#### **3.1. *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)***

Se realizó la reacción en un volumen final de 25µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM de cada dNTP (*Fermentas*), 0.8µM de cada cebador y 1 unidad de enzima.

#### **3.2. *U-Taq DNA Polymerase (SBS) y Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)***

Se realizó la reacción en un volumen final de 25µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante (conteniendo 1.5mM MgCl<sub>2</sub>), 0.4mM de cada dNTP (*Fermentas*), 0.8µM de cada cebador y 1.5 unidades de enzima.

#### **3.3. *AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen)***

Se realizó la reacción en un volumen final de 50µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante (conteniendo 0.3mM de cada dNTP y 1mM de MgSO<sub>4</sub>), 0.2µM de cada cebador y 2.5 unidades de enzima

#### **3.4. *PCR de colonia (U-Taq DNA Polymerase – SBS)***

Se realizó la reacción en un volumen final de 15µl conteniendo el *buffer* recomendado por el fabricante (conteniendo 1.5mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3mM de cada dNTP (*Fermentas*), 0.2µM de cada cebador y 0.5 unidades de enzima.

En la                    se resumen las condiciones de reacción y los parámetros de amplificación.

Tabla 15: Resumen de las condiciones de reacción y los parámetros de amplificación utilizados en las reacciones de PCR durante el desarrollo de este trabajo

Protocolo N°	RACE 3'			RACE 5'			pPICZ			Colonia 2			pET141			Colonia 2			pPCR ADING		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ADN polimerasa*	SBS	Invitrogen	Pfx	SBS	Long	SBS	SBS	Invitrogen	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	SBS	
Volumen de reacción (µL)	25	25	50	25	25	25	15	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
dNTPs (mM)	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
Cebadores (µM)	0.8	0.8	0.2	0.8	0.8	0.8	0.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	
Unidades de enzima	1.5	1	2.5	1.5	1.25	1	0.5	1.25	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
Mg <sup>2+</sup> (mM)	1.5	2	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
Desnaturalización inicial	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 2min	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min	94°C / 5min											
N° Ciclos	35	35	35	35	35	30	30	30	35	30	30	30	30	35	30	30	30	35	30	35	
Desnaturalización	94°C / 45seg	94°C / 45seg	94°C / 30seg	94°C / 45seg	94°C / 45seg	94°C / 30seg	94°C / 30seg	94°C / 30seg	94°C / 45seg	94°C / 30seg	94°C / 30seg	94°C / 30seg	94°C / 30seg	94°C / 45seg	94°C / 1min	94°C / 45seg	94°C / 1min	94°C / 45seg	94°C / 1min	94°C / 45seg	
Hibridación de cebadores	Tann / 45seg	Tann / 45seg	Tann / 30seg	Tann / 45seg	Tann / 45seg	Tann / 30seg	Tann / 30seg	Tann / 30seg	Tann / 45seg	Tann / 30seg	Tann / 30seg	Tann / 30seg	Tann / 30seg	Tann / 45seg	Tann / 1min	Tann / 45seg	Tann / 1min	Tann / 45seg	Tann / 1min	Tann / 45seg	
Polimerización	72°C / 1min	72°C / 1min	68°C / 1min	72°C / 1min	68°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 1min										
Extensión final	72°C / 7min	72°C / 7min	68°C / 10min	72°C / 7min	68°C / 10min	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min	72°C / 7min									

\*: Condiciones de reacción \*\* Parámetros de ciclado, se indica Temperatura / Tiempo (min: minutos, seg: segundos). Tann indica temperaturas variables determinadas en el texto

**1:** RACE 3' (Punto 3.1), RACE 5' (Punto 3.2), PPA: Amplificación con cebadores degenerados (Punto 3.3), Colonia 1: PCR de colonia de bacterias (Punto 3.3), pET141: Clonado en pET141a para expresión en *E. coli* (Punto 4.1.1), pPICZ: Clonado en pPICZaA para expresión en *P. pastoris* (Punto 4.2.1), Colonia 2: PCR de colonia de levaduras (Punto 4.2.3.1), PCR ADING: PCR a partir de ADING de levaduras (Punto 4.2.3.2)

A: Marca de la ADN polimerasa

**§:** Touchdown PCR: Desnaturalización inicial: 2 min / 94°C. 5 ciclos de (Desnaturalización: 94°C / 20 seg, hibridación/polimerización: 68°C / 5 min), 5 ciclos de (Desnaturalización: 94°C / 20 seg, hibridación: 65°C / 30 seg, polimerización: 6 min / 68°C), 25 ciclos (Desnaturalización: 94°C / 20 seg, hibridación: Tann (según texto) / 30 seg, polimerización: 6 min / 68°C). Extensión final de 15 minutos a 68°C.

## 4. Clonado de productos de PCR.

### 4.1. Ligación al vector T

Una vez purificado los productos de PCR de interés, los mismos se ligaron al vector *pGEM-T-Easy* (Promega) o al vector *pJET1/blunt* (Fermentas) según lo indicado, siguiendo las instrucciones de cada fabricante. En la Figura 52 (A y B) se muestran los mapas de los vectores utilizados en el curso de este trabajo

### 4.2. Ligación a vectores de expresión.

Se realizó un clonado direccional mediante digestión del inserto de interés y los plásmidos (Figura 52, C a E) con enzimas de restricción. Una vez purificados los productos digeridos estos fueron ligados con la enzima *T4 DNA Ligase* (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 4.3. Transformación

Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* (varias cepas, según lo indicado) por *shock* térmico. Para ello, se descongelaron las células competentes en hielo durante 10 minutos y se agregó el total de la mezcla de ligación. Se incubó durante 20 minutos en hielo y se realizó un *shock* térmico durante 2 minutos a 37°C con una breve incubación posterior en hielo. Se adicionó 600µl de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación a 37°C durante 60 minutos. Se plaquearon en medio LB-Agar o LB *Low Salt*- Agar (para la transformación con *pPICZαA*) conteniendo el antibiótico adecuado dependiendo de la cepa y del vector (ver Tabla 15). En los casos en que el vector presentara selección por complementación en  $\alpha$ , se adicionó a las placas 130µM IPTG y 30µg/ml Xgal. Se incubaron las placas toda la noche a 37°C para la formación de colonias.

Tabla 15: **Antibióticos utilizados en las transformaciones de células de *Escherichia coli***

Plásmido o Cepa	Antibiótico	Concentración Final
<i>pGEM-T-Easy</i> (Promega)	Ampicilina	100µg/ml
<i>pJET1.1</i> (Fermentas)	Ampicilina	100µg/ml
<i>pET41a</i> (Novagen)	Kanamicina	50µg/ml
BL21 <i>pLys</i>	Cloranfenicol	50µg/ml
BL21 <i>CodonPlus</i>	Cloranfenicol	50µg/ml
<i>pPICZαA</i> (Invitrogen)	Zeocina	25µg/ml

Tabla 16: Genotipos de las cepas de *E. coli* utilizadas

Cepa	Genotipo
XL1 – Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, Δ(lac-proAB) [F', proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)]</i>
DH5α	<i>F<sup>-</sup>, (φ80lacZΔM15), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>
BL21 Star	<i>E. coli B, F<sup>-</sup>, dcm, ompT, hsdSB(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), gal, rne131(DE3)</i>
BL21 CodonPlus RIL	<i>E. coli B, F<sup>-</sup>, dcm<sup>+</sup>, ompT, hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), Tet<sup>r</sup>, gal, λ(DE3), endA, Hte, [argU ileY leuWCam<sup>r</sup>]</i>
BL21 pLysS	<i>E. coli B, F<sup>-</sup>, dcm, ompT, hsdS(rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>), gal, λ(DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]</i>
SHuffle T7	<i>F', lac, pro, lacIQ/Δ(ara-leu)7697, araD139, fhuA2, lacZ::T7 gene1, Δ(phoA)Pvull, por, ahpC*, galE (or U), galK, λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq), ΔtrxB, rpsL150(StrR), Δgor, Δ(malF)3</i>

#### 4.4. Verificación de la presencia de inserto

En el caso del rastreo de varias colonias en simultáneo, se ordenaron las colonias aisladas obtenidas de la transformación en placas de LB conteniendo el antibiótico adecuado y se realizó una PCR de colonia (Punto 4.4.1). En el caso de clones verificados por PCR de colonia o de rastreo de pocos clones se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico (Punto 4.4.2) y digestión con enzimas de restricción (Punto 4.4.2)

##### 4.4.1. PCR de colonia

Se resuspendió una colonia aislada en 10μl de agua estéril y se utilizó 1μl como molde para realizar las reacciones de PCR en un volumen final de 15μl. Se utilizaron 0.5 unidades de la enzima *U-Taq DNA Polymerase (SBS)* junto a los cebadores T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y SP6 (5'-TAGGTGACTATAGAATA-3') complementarios a los promotores flanqueantes al sitio de policlonado del vector. Se utilizó el *buffer* suministrado con la enzima conteniendo 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3mM de cada dNTP y 0.2μM de cada cebador. El ciclado consistió de una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, hibridación de cebadores a 54°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 45 segundos. Culminados los ciclos se realizó una extensión final de 5 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en *buffer* TAE 1X y visualizados con *Geldre*<sup>TM</sup> (*Viotia*). Se realizaron preparaciones de ADN plasmídico de las colonias cuyo producto de amplificación fue superior al producto de una colonia transformada con plásmido religado sin inserto. Como control positivo se incluyó una colonia conteniendo un plásmido con la región codificante de McCRISP2 verificada por secuenciación.

##### 4.4.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico

Se realizó un cultivo en 3 ml de LB líquido con el antibiótico adecuado (Ver Tabla 15) a partir de una colonia aislada y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifugó 30 segundos a 13600xg para coleccionar las células y se descartó la totalidad del medio. Se resuspendieron las células en 200μl de solución I (Tris – HCl 50mM pH8, EDTA 10mM) sin vórtex y se agregó 200μl de solución II (NaOH 200mM, SDS 1%). Se mezcló por inversión suavemente y

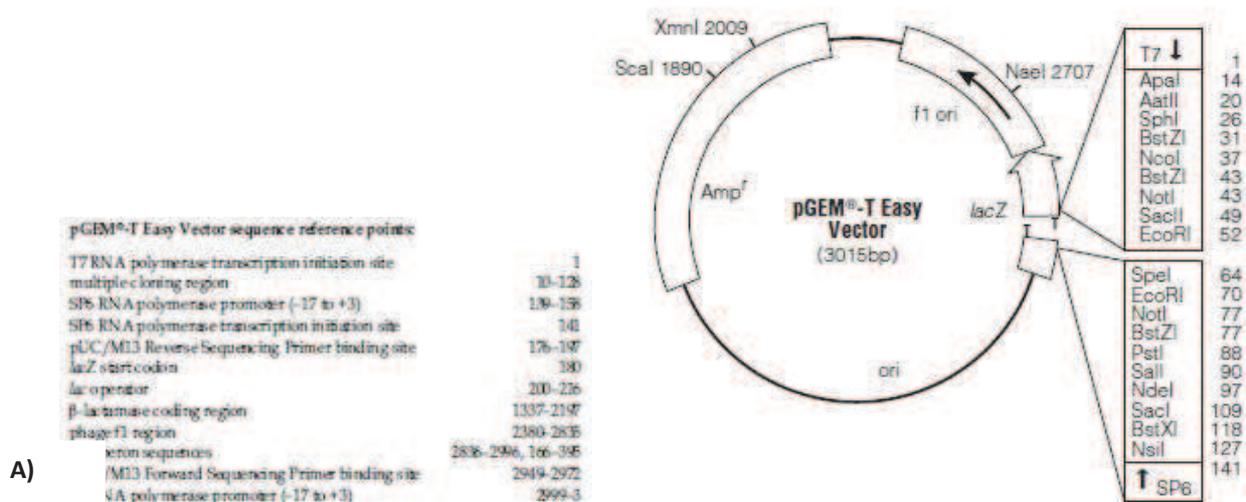
se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 200µl de solución III (Acetato de potasio 3M pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugó 20 minutos a 12000xg a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 10µg de RNasa y se incubó 15 minutos a 37°C. Se purificó el ADN plasmídico mediante el agregado de 1 volumen de cloroformo : isoamílico (24:1) y centrifugación para separar las fases. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó agregando un volumen de isopropanol, centrifugando por 15 minutos a 10000xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 300µl de Etanol 70%. Se secó bajo lámpara y se resuspendió en 30 µl de agua mQ.

#### 4.4.3. Digestión con enzimas de restricción

Se incubaron las preparaciones de ADN plasmídico con enzimas de restricción que digieran al vector en sitios flanqueantes al inserto. Se utilizaron 5 unidades de la enzima *EcoRI* (*Fermentas-Thermo Scientific*) en el caso de productos de PCR sin sitios de restricción en sus extremos clonados en *pGEM-T-Easy* o 5 unidades de las enzimas *XhoI*, *BclI* (isoezquisómero de *SpeI*) o *Sall* (*Fermentas*) que digieren los extremos del producto de PCR especificados en cada caso.

#### 4.4.4. Secuenciación de ADN

Los clones positivos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo o a MacroGen Korea. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el programa *Chromas Lite* (versión 2.1 *Technelysium Pty. Ltd*)

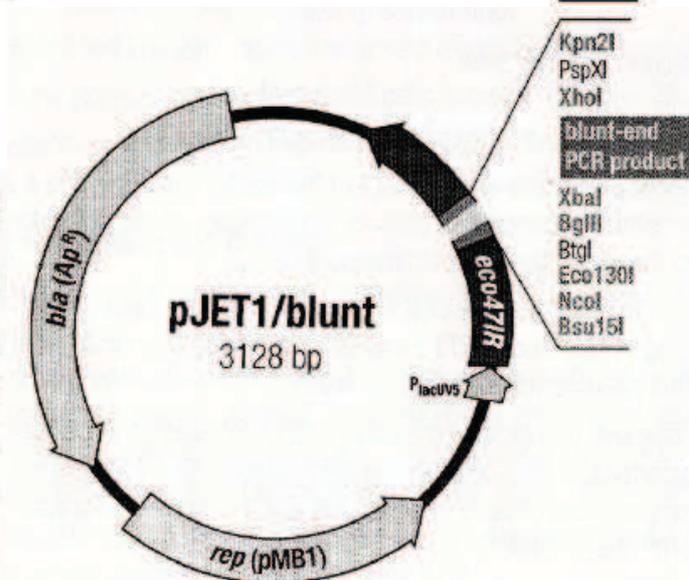


A)

**Genetic elements of the pJET1/blunt Cloning Vector**

Element	Function	Position (bp)
rep (pMB1)	A replicon (rep) from the pMB1 plasmid is responsible for the replication of pJET1	1294-1900
Replication start	Initiation of the replication	1306 ± 1
bla (Ap <sup>r</sup> )	$\beta$ -lactamase gene conferring resistance to ampicillin. Used for selection and maintenance of recombinant <i>E. coli</i> cells	2058-2920
eco47IR	Lethal gene <i>eco47IR</i> enables positive selection of the recombinants	107-679
P <sub>lacUV5</sub>	Modified P <sub>lac</sub> promoter for expression of the <i>eco47IR</i> gene at a level sufficient to provide positive selection without IPTG induction	880-1010
Multiple cloning site (MCS)	Mapping, screening and excision of the cloned insert	540-670
Primer binding sites:		
pJET1 Forward Sequencing	Sequencing of insert, colony PCR	481-471
Reverse Sequencing	Sequencing of insert, colony PCR	534-510

B)



**Comments for pPICZ $\alpha$  A**  
3593 nucleotides

*Bgl*

5' AOX1 promoter region: bases 1-941  
 5' AOX1 priming site: bases 855-875  
 $\alpha$ -factor signal sequence: bases 941-1207  
 $\alpha$ -factor priming site: bases 1144-1164  
 Multiple cloning site: bases 1208-1276  
*c-myc* epitope: bases 1275-1304  
 Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337  
 3' AOX1 priming site: bases 1423-1443  
 AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682  
 TEF1 promoter: bases 1683-2093  
 EM7 promoter: bases 2095-2162  
*Sh ble* ORF: bases 2163-2537  
 $\gamma$ CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855  
 pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

C)

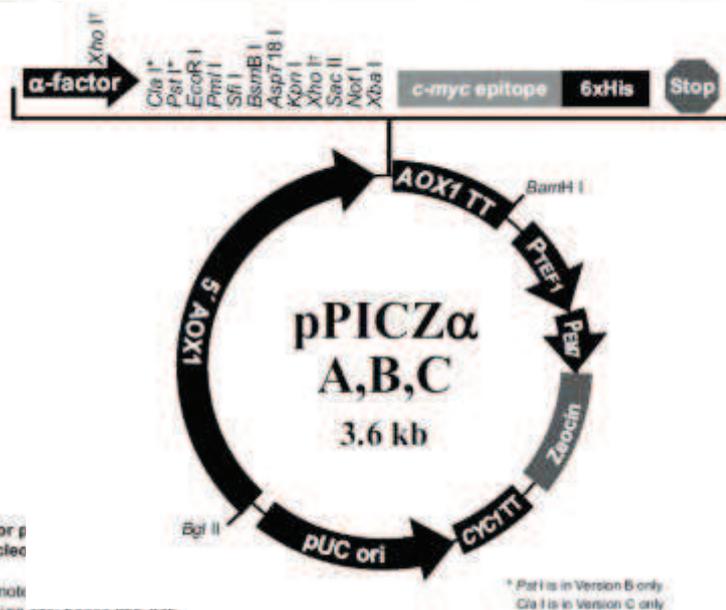




Figura 52: **Vectores utilizados durante este trabajo.** A) Vector *pGEM – T Easy* (Promega). B) Vector *pJET1/blunt* (Fermentas). C) Vector *pPICZaA* (Invitrogen) para expresión en *P. pastoris*. D) Vector *pET22b (+)* (Novagen) para expresión en *E. coli* con péptido señal de secreción al periplasma. E) Vector *pET41a (+)* (Novagen) para expresión en *E. coli* como fusión a GST.

## 5. Marcadores de peso molecular

### 5.1. ADN

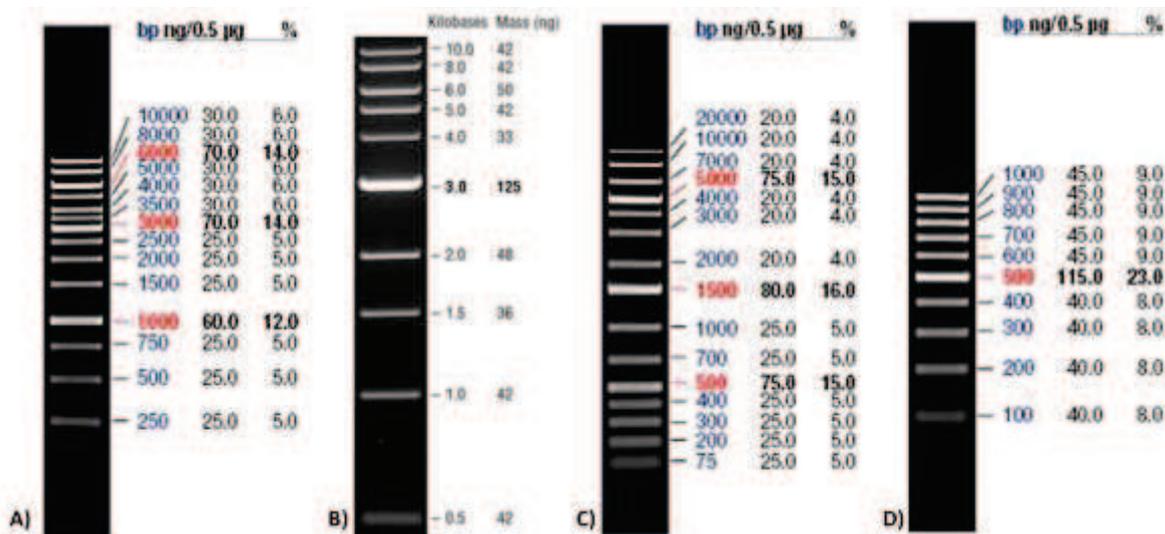


Figura 53; **Marcadores de peso molecular de ADN.** A) GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder (Fermentas, #SM1311), B) 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs, #N3232L) C) GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas, #SM1332), D) GeneRuler™ 100pb DNA Ladder (Fermentas, #SM0241).

### 5.2. Proteínas

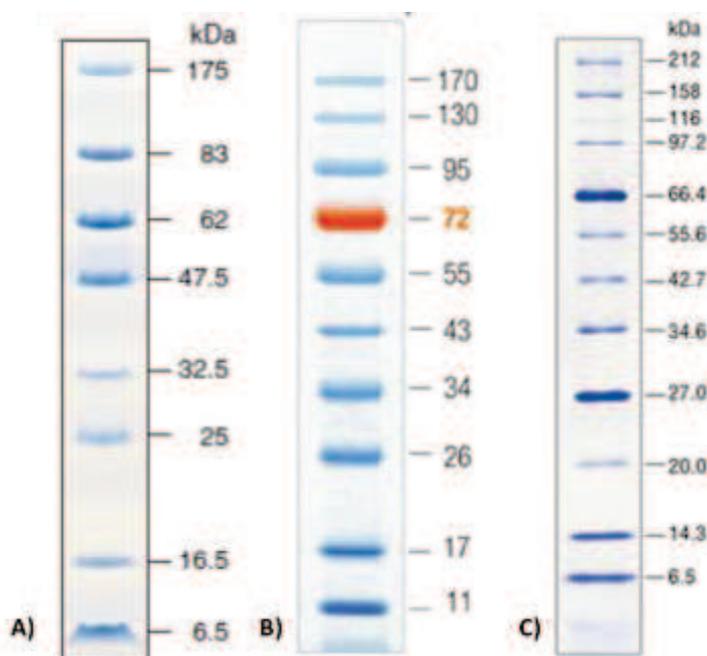


Figura 54: **Marcadores de peso molecular de proteínas.** A) Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175kDa) (New England Biolabs, #P7708S), B) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, #SM0671), C) Protein Marker, Broad Range (Premixed Format) (New England Biolabs, #P7702S)

**6. Cálculos realizados a partir de los valores obtenidos por RT-qPCR**

**6.1. Cálculo de la variación en las condiciones ensayadas de los genes elegidos**

Tabla 17: Cálculo del valor  $2^{-\Delta Ct}$  para los genes estudiados con respecto al día 0 o al día 2.

GAPDH				$2^{-\Delta Ct}$ // día 0			$2^{-\Delta Ct}$ // día 2			18S				$2^{-\Delta Ct}$ // día 0			$2^{-\Delta Ct}$ // día 2		
Muestra	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	Muestra	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	
0d	1	11,66	1,31			0,43		0d	1	4,07	0,96			0,99					
	2	11,75	1,23	1,05	0,38	0,40	0,34		0,12	2	4,02	1,00	1,00	0,04	1,02	1,03	0,04		
	3	12,74	0,62			0,20				3	3,95	1,04			1,07				
2d	1	10,50	2,93			0,95			2d	1	4,04	0,98			1,01				
	2	10,22	3,56	3,10	0,40	1,15	1,01	0,13		2	4,04	0,98	0,97	0,01	1,01	1,00	0,01		
	3	10,56	2,81			0,91				3	4,07	0,96			0,99				
4d	1	10,43	3,07			1,00			4d	1	4,09	0,95			0,97				
	2	10,56	2,81	2,39	0,97	0,91	0,77	0,32		2	4,06	0,97	0,97	0,02	0,99	0,99	0,02		
	3	11,70	1,27			0,41				3	4,03	0,99			1,01				
6d	1	9,54	5,70			1,85			6d	1	4,08	0,95			0,98				
	2	12,24	0,88	2,83	2,54	0,28	0,92	0,82		2	4,00	1,01	0,99	0,03	1,04	1,02	0,03		
	3	11,11	1,92			0,62				3	3,99	1,02			1,04				
8d	1	11,02	2,04			0,66			8d	1	4,04	0,98			1,01				
	2	10,64	2,66	4,27	3,34	0,86	1,39	1,08		2	4,05	0,97	0,96	0,04	1,00	0,98	0,04		
	3	9,03	8,11			2,63				3	4,14	0,92			0,94				
10d	1	10,75	2,46			0,80			10d	1	4,03	0,99			1,01				
	2	9,78	4,82	3,50	1,20	1,57	1,14	0,39		2	4,01	1,00	1,00	0,01	1,03	1,03	0,01		
	3	10,36	3,23			1,05				3	4,00	1,01			1,04				

TPM				$2^{-\Delta Ct}$ // día 0			$2^{-\Delta Ct}$ // día 2			CRISP				$2^{-\Delta Ct}$ // día 0			$2^{-\Delta Ct}$ // día 2		
Muestra	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	Muestra	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	$2^{-\Delta Ct}$	P <sup>A</sup>	D.E <sup>B</sup>	
0d	1	12,20	1,81			2,54		0d	1	12,95	1,95			69,39					
	2	12,86	1,14	1,14	0,66	1,61	1,61		0,93	2	14,38	0,72	1,13	0,71	25,75	40,12	25,35		
	3	14,10	0,48			0,68				3	14,41	0,71			25,22				
2d	1	13,78	0,60			0,85			2d	1	20,09	0,01			0,49				
	2	13,46	0,75	0,72	0,10	1,06	1,01	0,14		2	18,10	0,05	0,03	0,02	1,95	1,16	0,74		
	3	13,40	0,79			1,11				3	19,01	0,03			1,04				
4d	1	13,12	0,95			1,34			4d	1	20,77	0,01			0,31				
	2	13,72	0,63	0,62	0,34	0,89	0,88	0,47		2	19,18	0,03	0,02	0,01	0,92	0,60	0,31		
	3	14,87	0,28			0,40				3	19,89	0,02			0,57				
6d	1	14,54	0,36			0,50			6d	1	20,93	0,01			0,27				
	2	14,82	0,29	0,50	0,30	0,41	0,70	0,42		2	20,71	0,01	0,01	0,00	0,32	0,29	0,03		
	3	13,31	0,84			1,18				3	20,96	0,01			0,27				
8d	1	15,70	0,16			0,22			8d	1	22,52	0,00			0,09				
	2	15,18	0,23	0,29	0,17	0,32	0,40	0,23		2	20,03	0,01	0,01	0,01	0,51	0,40	0,27		
	3	14,13	0,47			0,67				3	19,85	0,02			0,58				
10d	1	13,69	0,64			0,91			10d	1	22,77	0,00			0,08				
	2	14,33	0,41	0,48	0,14	0,58	0,67	0,20		2	23,96	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,03		
	3	14,44	0,38			0,54				3	24,38	0,00			0,03				

A: Promedio de los tres valores. B: Desviación Estándar

## 6.2. Cálculo de la razón de cambio de McCRISP2 en las condiciones ensayadas

Tabla 18: Valores de Ct y cálculo de la razón de cambio en la expresión de McCRISP2 respecto a GAPDH

CRISP / GAPDH		Ct (tx)		Ct (t2) Promedio		$\Delta Ct$ (CRISP / GAPDH) tx	$\Delta Ct$ (CRISP / GAPDH) t2	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\mu$	$\sigma$
		CRISP	GAPDH	CRISP	GAPDH	(Ct CRISP - Ct GAPDH) tx	(Ct CRISP - Ct GAPDH)t2				
2d	1	20,09	10,50	19,07	10,43	9,59	8,64	0,95	0,52	1,12	0,59
	2	18,10	10,22			7,88		-0,76	1,69		
	3	19,01	10,56			8,45		-0,19	1,14		
4d	1	20,77	10,43			10,34		1,70	0,31	0,90	0,54
	2	19,18	10,56			8,62		-0,02	1,01		
	3	19,89	11,70			8,19		-0,45	1,37		
6d	1	20,93	9,54			11,39		2,75	0,15	0,57	0,50
	2	20,71	12,24			8,47		-0,17	1,13		
	3	20,96	11,11			9,85		1,21	0,43		
8d	1	22,52	11,02			11,50		2,86	0,14	0,32	0,24
	2	20,03	10,64			9,39		0,75	0,59		
	3	19,85	9,03			10,82		2,18	0,22		
10d	1	22,77	10,75	12,02	3,38	0,10	0,05	0,04			
	2	23,96	9,78	14,18	5,54	0,02					
	3	24,38	10,36	14,02	5,38	0,02					

Tabla 19: Valores de Ct y cálculo de la razón de cambio en la expresión de McCRISP2 respecto a TPM

CRISP / TPM		Ct (tx)		Ct (t2) Promedio		$\Delta Ct$ (CRISP / TPM) tx	$\Delta Ct$ (CRISP / TPM) t2	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\mu$	$\sigma$
		CRISP	TPM	CRISP	TPM	(Ct CRISP - Ct TPM) tx	(Ct CRISP - Ct TPM)t2				
2d	1	20,09	13,78	19,07	13,55	6,31	5,52	0,79	0,58	1,12	0,65
	2	18,1	13,46			4,64	5,52	-0,88	1,84		
	3	19,01	13,4			5,61	5,52	0,09	0,94		
4d	1	20,77	13,12			7,65	5,52	2,13	0,23	0,90	0,61
	2	19,18	13,72			5,46	5,52	-0,06	1,04		
	3	19,89	14,87			5,02	5,52	-0,50	1,41		
6d	1	20,93	14,54			6,39	5,52	0,87	0,55	0,52	0,27
	2	20,71	14,82			5,89	5,52	0,37	0,77		
	3	20,96	13,31			7,65	5,52	2,13	0,23		
8d	1	22,52	15,7			6,82	5,52	1,30	0,41	0,96	0,60
	2	20,03	15,18			4,85	5,52	-0,67	1,59		
	3	19,85	14,13			5,72	5,52	0,20	0,87		
10d	1	22,77	13,69	9,08	5,52	3,56	0,08	0,06	0,02		
	2	23,96	14,33	9,63	5,52	4,11	0,06				
	3	24,38	14,44	9,94	5,52	4,42	0,05				

**bibliografía**

- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52.
- Arakawa, T., Tsumoto, K., 2003. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 148–152.
- Arsac, C., Walbum, S., Sarciron, M.E., Petavy, A.F., 1997. Histochemical observations of alkaline phosphatase activity of *Echinococcus multilocularis* during in vivo development in golden hamsters, an alternative definitive host. *Exp. Anim.* 46, 25–30.
- Barret, N.J., Smyth, J.D., Ong, S.J., 1982. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro. *Int. J. Parasitol.* 12, 315–322.
- Bethony, J.M., Simon, G., Diemert, D.J., Parenti, D., Desrosiers, A., Schuck, S., Fujiwara, R., Santiago, H., Hotez, P.J., 2008. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. *Vaccine* 26, 2408–2417.
- Brehm, K., Jensen, K., Frosch, M., 2000. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* 275, 38311–38318.
- Britos, L., 2000. Estudios celulares y moleculares del desarrollo estrobilar de *Mesocestoides corti*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Britos, L., Domínguez, L., Ehrlich, R., Marín, M., 2000. Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocestoides corti* in vitro. *J. Helminthol.* 74, 295–299.
- Britos, L., Lalanne, A.I., Castillo, E., Cota, G., Señorale, M., Marín, M., 2007. *Mesocestoides corti* (syn. *vogae*, cestoda): Characterization of genes encoding Cysteine-Rich Secreted Proteins (CRISP). *Exp. Parasitol.* 116, 95–102.
- Brooks, D.E., Means, A.R., Wright, E.J., Singh, S.P., Tiver, K.K., 1986. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur. J. Biochem.* 161, 13–18.
- Cabrera, L.D., Bottomley, S.P., 2004. Protein expression and refolding – a practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol. Annu. Rev.* 10, 31–50.
- Canclini, L., Esteves, A., 2007. Preliminary analysis of cold stress responsive proteins in *Mesocestoides corti* larvae. *Exp. Parasitol.* 116, 314–319.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 45–66.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., Frasconi, P., 2006. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* 34, W177–W181.

- Chalmers, I.W., McArdle, A.J., Coulson, R.M., Wagner, M. a, Schmid, R., Hirai, H., Hoffmann, K.F., 2008. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics* 9, 89.
- Choudhary, V., Schneider, R., 2012. Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 16882–16887.
- Cornelissen, B.J., Hooft van Huijsduijnen, R.A.M., Van Loon, L.C., Bol, J.F., 1986. Molecular characterization of messenger RNAs for “pathogenesis related” proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco. *EMBO J.* 5, 37–40.
- Corvo, I., Cancela, M., Cappetta, M., Pi-Denis, N., Tort, J.F., Roche, L., 2009. The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 41–47.
- Costábile, A., 2009. Contribución al estudio de las proteínas tipo CRISP en el cestodo parásito *Mesocestoides corti*. Clonado y producción de la proteína McCRISP2 recombinante. Tesina de graduación. Lic en Bioquímica. Facultad de Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Crosbie, P.R., Nadler, S.A., Platzer, E.G., Kerner, C., Mariaux, J., Boyce, W.M., 2000. Molecular systematics of *Mesocestoides* spp. (Cestoda: Mesocestoididae) from domestic dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.* 86, 350–357.
- Cui, S.-J., Xu, L.-L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C.-Y., Feng, Z., Yang, P.-Y., Hu, W., Liu, F., 2013. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions. *J. Proteomics* 84, 158–175.
- De Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., Goloubinoff, P., 2005. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* 10, 329–339.
- De Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N., 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 27, 561–566.
- Del Valle, A., Jones, B.F., Harrison, L.M., Chadderdon, R.C., Cappello, M., 2003. Isolation and molecular cloning of a secreted hookworm platelet inhibitor from adult *Ancylostoma caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 167–177.
- Eckert, J., von Brand, T., Voge, M., 1969. Asexual multiplication of *Mesocestoides corti* (Cestoda) in the intestine of dogs and skunks. *J. Parasitol.* 55, 241–249.
- Esposito, D., Chatterjee, D.K., 2006. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 353–358.
- Fang, K.S., Vitale, M., Fehlner, P., King, T.P., 1988. cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 895–899.

- Fernández, C., Gregory, W.F., Loke, P., Maizels, R.M., 2002. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 171–180.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coggill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.-R.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L.L., Bateman, A., 2008. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 36, D281–D288.
- Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Ribeiro, J.M.C., 2002. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 205, 2429–2451.
- Gallagher, S., 2003. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins, en: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 10.2A.4–10.2A.9.
- Garcia, H.H., Moro, P.L., Schantz, P.M., 2007. Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 489–494.
- Gibbs, G.M., Roelants, K., O'Bryan, M.K., 2008. The CAP superfamily: Cysteine-Rich Secretory Proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 proteins-roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr. Rev.* 29, 865–897.
- Gibbs, G.M., Scanlon, M.J., Swarbrick, J., Curtis, S., Gallant, E., Dulhunty, A.F., O'Bryan, M.K., 2006. The Cysteine-Rich Secretory Protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 4156–4163.
- Goud, G.N., Bottazzi, M.E., Zhan, B., Mendez, S., Deumic, V., Plieskatt, J., Liu, S., Wang, Y., Bueno, L., Fujiwara, R., Samuel, A., Ahn, S.Y., Solanki, M., Asojo, O.A., Wang, J., Bethony, J.M., Loukas, A., Roy, M., Hotez, P.J., Goud, G.N., Bottazzi, M.E., Ahn, S.Y., 2005. Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine* 23, 4754–4764.
- Goud, G.N., Zhan, B., Ghosh, K., Loukas, A., Hawdon, J., Dobardzic, A., Deumic, V., Liu, S., Dobardzic, R., Zook, B.C., Jin, Q., Liu, Y., Hoffman, L., Chung-Debose, S., Patel, R., Mendez, S., Hotez, P.J., 2004. Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant Ancylostoma-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *J. Infect. Dis.* 189, 919–929.
- Guo, M., Teng, M., Niu, L., Liu, Q., Huang, Q., Hao, Q., 2005. Crystal structure of the Cysteine-Rich Secretory Protein Stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K<sup>+</sup> channel inhibitor-like fold. *J. Biol. Chem.* 280, 12405–12412.
- Gustafsson, M.K., 1991. Skin the tapeworms before you stain their nervous system! A new method for whole-mount immunocytochemistry. *Parasitol. Res.* 77, 509–516.
- Hailu, T.T., Foit, L., Bardwell, J.C.A., 2013. In vivo detection and quantification of chemicals that enhance protein stability. *Anal. Biochem.* 434, 181–186.

- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hawdon, J.M., Hotez, P.J., 1996. Hookworm: developmental biology of the infectious process. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 618–623.
- Hawdon, J.M., Jones, B.F., Hoffman, D.R., Hotez, P.J., 1996. Cloning and characterization of ancylostoma-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J. Biol. Chem.* 271, 6672–6678.
- Hawdon, J.M., Narasimhan, S., Hotez, P.J., 1999. Ancylostoma-secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 149–165.
- Henry, A., 1927. Tetrathyridium of *Mesocestoides*. *Rec. Med. Vet. Ec. Alfort.* 103, 147–152.
- Hess, E., 1980. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925: tegumen and parenchyma. *Z. Parasitenkd.* 61, 135–159.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M., 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 1–11.
- Holzinger, A., Phillips, K.S., Weaver, T.E., 1996. Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. *Biotechniques* 20, 804–808.
- Hwang, J.S., Ohyanagi, H., Hayakawa, S., Osato, N., Nishimiya-Fujisawa, C., Ikeo, K., David, C.N., Fujisawa, T., Gojobori, T., 2007. The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of Hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14735–14740.
- Inan, M., Aryasomayajula, D., Sinha, J., Meagher, M.M., 2006. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 771–778.
- Ivanciuc, O., Garcia, T., Torres, M., Schein, C.H., Braun, W., 2009. Characteristic motifs for families of allergenic proteins. *Mol. Immunol.* 46, 559–568.
- Jacobs, P.P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R., Callewaert, N., 2009. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.* 4, 58–70.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L., 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36, W5–W9.
- Kato, H., Anderson, J.M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Sangare, C.S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Dombia, S., Valenzuela, J.G., 2006. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics* 7, 226.

- Kemmerling, U., Cabrera, G., Campos, E.O., Inestrosa, N.C., Galanti, N., 2006. Localization, specific activity, and molecular forms of acetylcholinesterase in developmental stages of the cestode *Mesocestoides corti*. *J. Cell. Physiol.* 206, 503–509.
- Kolaj, O., Spada, S., Robin, S., Wall, J.G., 2009. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 8, 9.
- Kovalick, G.E., Griffin, D.L., 2005. Characterization of the SCP/TAPS gene family in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 825–835.
- Koziol, U., 2006. Estudio sobre genes HD en platelmintos. Tesina de graduación. Lic. en Ciencias Biológicas. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Koziol, U., 2009. Caracterización de células proliferantes en *Mesocestoides corti* (Cestoda) , y de genes pumilio como posibles marcadores moleculares de las mismas. Tesis de Mestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Koziol, U., Costábile, A., Domínguez, M.F., Iriarte, A., Alvite, G., Kun, A., Castillo, E., 2011. Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 181–191.
- Koziol, U., Domínguez, M.F., Marín, M., Kun, A., Castillo, E., 2010. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front. Zool.* 7, 22.
- Koziol, U., Lalanne, A.I., Castillo, E., 2009. Hox genes in the parasitic platyhelminthes *Mesocestoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: evidence for a reduced Hox complement. *Biochem. Genet.* 47, 100–116.
- Koziol, U., Marín, M., Castillo, E., 2008. Pumilio genes from the Platyhelminthes. *Dev. Genes Evol.* 218, 47–53.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125.
- Lalanne, A.I., 2003. Estudios moleculares del desarrollo de cestodos: genes Hox y LIM-Homeobox de *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides corti*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Lalanne, A.I., Britos, L., Ehrlich, R., Castillo, E., 2004. *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Exp. Parasitol. Parasitol* 108, 169–175.
- Laschuk, A., Monteiro, K.M., Vidal, N.M., Pinto, P.M., Duran, R., Cerveñanski, C., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2011. Proteomic survey of the cestode *Mesocestoides corti* during the first 24 hours of strobilar development. *Parasitol. Res.* 108, 645–656.
- Li, M., Su, Z.-G., Janson, J.-C., 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 33, 1–10.

- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lobstein, J., Emrich, C. a, Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M., 2012. SHuffle , a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb. Cell Fact.* 11, 56.
- Logan-Klumpler, F.J., De Silva, N., Boehme, U., Rogers, M.B., Velarde, G., McQuillan, J. a, Carver, T., Aslett, M., Olsen, C., Subramanian, S., Phan, I., Farris, C., Mitra, S., Ramasamy, G., Wang, H., Tivey, A., Jackson, A., Houston, R., Parkhill, J., Holden, M., Harb, O.S., Brunk, B.P., Myler, P.J., Roos, D., Carrington, M., Smith, D.F., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., 2012. GeneDB--an annotation database for pathogens. *Nucleic Acids Res.* 40, D98–D108.
- Loos-Frank, B., 1991. One or two intermediate hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae). *Parasitol. Res.* 77, 726–728.
- Loukas, A., Bethony, J., Brooker, S., Hotez, P., 2006. Hookworm vaccines: past, present, and future. *Lancet Infect. Dis.* 6, 733–741.
- Mans, B.J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Schwan, T.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Hammer, C.H., Ribeiro, J.M., 2008. Comparative sialomics between hard and soft ticks: Implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 42–58.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V, Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R. a, Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S.H., 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39, D225–D229.
- Milne, T.J., Abbenante, G., Tyndall, J.D.A., Halliday, J., Lewis, R.J., 2003. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the Pathogenesis-Related protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 278, 31105–31110.
- Mizuki, N., Sarapata, D.E., Garcia-Sanz, J.A., Kasahara, M., 1992. The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: molecular structure, mode of expression in spermatogenesis , and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm. Genome* 3, 274–280.
- Moyle, M., Foster, D.L., McGrath, D.E., Brown, S.M., Laroche, Y., De Meutter, J., Stanssens, P., Bogowitz, C. a, Fried, V. a, Ely, J. a, 1994. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *J. Biol. Chem.* 269, 10008–10015.
- Niderman, T., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., Mosinger, E., Ag, S.A., Witterswill, C.H., 1995. Pathogenesis-Related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiol.* 108, 17–27.
- Nisbet, A.J., McNeilly, T.N., Wildblood, L. a, Morrison, A. a, Bartley, D.J., Bartley, Y., Longhi, C., McKendrick, I.J., Palarea-Albaladejo, J., Matthews, J.B., 2013. Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine In Press.*

- Nolan, M.A., Wu, L., Bang, H.J., Jelinsky, S.A., Roberts, K.P., Turner, T.T., Kopf, G.S., Johnston, D.S., 2006. Identification of rat Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. *Biol. Reprod.* 74, 984–991.
- Novagen, 2006. pET System manual. 11th Edition. Último acceso: Agosto 2013. [http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen\\_petsystem.pdf.%20](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf.%20)
- Novak, M., 1972. Quantitative studies on the growth and multiplication of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925 (Cestoda: Cyclophyllidea) in rodents. *Can. J. Zool.* 50, 1189–1196.
- Ong, S.J., Smyth, J.D., 1986. Effects of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia in vitro. *Int. J. Parasitol.* 16, 361–368.
- Padgett, K.A., Boyce, W.M., 2004. Life-history studies on two molecular strains of *Mesocestoides* (Cestoda: Mesocestoididae): identification of sylvatic hosts and infectivity of immature life stages. *J. Parasitol.* 90, 108–113.
- Padgett, K.A., Boyce, W.M., 2005. Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA. *J. Helminthol.* 79, 67–73.
- Padgett, K.A., Nadler, S.A., Munson, L., Sacks, B., Boyce, W.M., 2005. Systematics of *Mesocestoides* (Cestoda: Mesocestoididae): evaluation of molecular and morphological variation among isolates. *J. Parasitol.* 91, 1435–1443.
- Pellizza, L., 2010. Caracterización funcional de la proteína tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus* EgKU-7. Tesina de graduación. Lic. en Bioquímica. Fac. Ciencias - UdelaR. Montevideo - Uruguay.
- Pouchkina-Stantcheva, N.N., Cunningham, L.J., Olson, P.D., 2011. Spatial and temporal consistency of putative reference genes for real-time PCR in a model tapeworm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 180, 120–122.
- Rausch, R.L., 1994. Family Mesocestoididae Fuhrmann, 1907, en: Khalil, L.F., Jones, A., Bray, R.A. (Eds.), *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 309–314.
- Roberts, K.P., Ensrud, K.M., Wooters, J.L., Nolan, M. a, Johnston, D.S., Hamilton, D.W., 2006. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 122–127.
- Roberts, K.P., Johnston, D.S., Nolan, M.A., Wooters, J.L., Waxmonsky, N.C., Piehl, L.B., Ensrud-Bowlin, K.M., Hamilton, D.W., 2007. Structure and function of epididymal protein Cysteine-Rich Secretory Protein-1. *Asian J. Androl.* 9, 508–514.
- Schuren, F.H., Asgeirsdóttir, S. a, Kothe, E.M., Scheer, J.M., Wessels, J.G., 1993. The Sc7/Sc14 gene family of *Schizophyllum commune* codes for extracellular proteins specifically expressed during fruit-body formation. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2083–2090.

- Serrano, R.L., Kuhn, A., Hendricks, A., Helms, J.B., Sinning, I., Groves, M.R., 2004. Structural analysis of the human Golgi-Associated plant Pathogenesis Related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism. *J. Molecular Biol.* 339, 173–183.
- Sigrist, C.J. a, de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B. a, Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41, D344–D347.
- Soldatova, A.P., 1944. A contribution to the study of the development cycle in the cestode *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782), parasite of carnivorous mammals. *Compte Rendu l'Académie des Sci. l'URSS* 45, 310–312.
- Specht, D., Vogt, M., 1965. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *J. Parasitol.* 51, 268–272.
- Srivastava, H.D., 1939. A study of the life-history of a common tapeworm, *Mesocestoides lineatus* of Indian dogs and cats. *Indian J. Vet. Sci. Anim. Husb.* 9, 83–90.
- Storer, T.I., Usinger, R.L., Stebbins, R.C., Nybakken, J.W., Gifre, E., Fortes, M.-J., 1986. Platyhelminths, en: *Zoología General*. Omega S.A., Barcelona, España, pp. 412–430.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tapinos, N.I., Polihronis, M., Thyphronitis, G., Moutsopoulos, H.M., 2002. Characterization of the Cysteine-Rich Secretory Protein 3 gene as an early-transcribed gene with a putative role in the pathophysiology of Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 46, 215–222.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Thompson, R.C., Dunsmore, J.D., Hayton, A.R., 1979. *Echinococcus granulosus*: secretory activity of the rostellum of the adult cestode in situ in the dog. *Exp. Parasitol.* 48, 144–163.
- Thompson, R.C., Jue Sue, L.P., Buckley, S.J., 1982. In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. *Int. J. Parasitol.* 12, 303–314.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T., 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 28, 1–8.
- Udby, L., Cowland, J.B., Johnsen, A.H., Sørensen, O.E., Borregaard, N., Kjeldsen, L., 2002. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a Cysteine-Rich Secretory Protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *J. Immunol. Methods* 263, 43–55.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., 2002a. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol.* 205, 2843–2864.
- Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Francischetti, I.M.B., Ribeiro, J.M.C., 2002b. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1101–1122.

- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Van Loon, L.C., van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85–97.
- Vinzón, S.E., Pirpignani, M.L., Nowicki, C., Biscoglio de Jiménez Bonino, M., 2010. Molecular cloning and expression in *Pichia pastoris* of a hypoallergenic antigen 5. *Protein Expr. Purif.* 73, 23–30.
- Virginio, V.G., Monteiro, K.M., Drumond, F., de Carvalho, M.O., Vargas, D.M., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2012. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol. Biochem. Parasitol.* 183, 15–22.
- Voge, M., 1967. Development in vitro of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to young tetrathyridium. *J. Parasitol.* 53, 78–82.
- Voge, M., Coulombe, L.S., 1966. Growth and asexual multiplication in vitro of *Mesocestoides* tetrathyridia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 902–907.
- Voge, M., Seidel, J.S., 1968. Continuous growth in vitro of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to fully developed tetrathyridium. *J. Parasitol.* 54, 269–271.
- Wang, F., Liu, Y., Chen, J., Su, Z., 2005. Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control. *China Particuology* 3, 337–342.
- Webster, J.D., 1949. Fragmentary studies in the life history of the cestode *Mesocestoides latus*. *J. Parasitol.* 35, 83–90.
- Witenberg, G., 1934. Studies on the cestode genus *Mesocestoides*. *Arch. Zool. Ital.* 20, 487–508.
- Wung, J.L.L., Gascoigne, N.R.R., 1996. Antibody screening for secreted proteins expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechniques* 21, 808–812.
- Xu, X., Francischetti, I.M.B., Lai, R., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2012. Structure of protein having inhibitory disintegrin and leukotriene scavenging functions contained in single domain. *J. Biol. Chem.* 287, 10967–10976.
- Yamazaki, Y., Morita, T., 2004. Structure and function of snake venom Cysteine-Rich Secretory Proteins. *Toxicon* 44, 227–231.
- Yeats, C., Bentley, S., Bateman, A., 2003. New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Microbiol.* 3, 3.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G., 2007. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* 127, 335–347.

- Zhan, B., Liu, Y., Badamchian, M., Williamson, A., Feng, J., Loukas, A., Hawdon, J.M., Hotez, P.J., 2003. Molecular characterisation of the Ancylostoma-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum*. *Int. J. Parasitol.* 33, 897–907.
- Zhang, H., Loovers, H.M., Xu, L.-Q., Wang, M., Rowling, P.J.E., Itzhaki, L.S., Gong, W., Zhou, J.-M., Jones, G.W., Perrett, S., 2009. Alcohol oxidase (AOX1) from *Pichia pastoris* is a novel inhibitor of prion propagation and a potential ATPase. *Mol. Microbiol.* 71, 702–716.