



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio de la proteína de unión a caja TATA 1 de  
*Taenia solium* (TsTBP1).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Oscar Rodríguez Lima

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Abraham Landa Piedra

Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alicia González Manjarrez  
Dr. Angel Zarain Herzberg

Instituto de Fisiología Celular  
Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. Enero, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

PMDCB/1228/2015...1a

**Oscar Rodríguez Lima**  
**Alumno (a) del Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

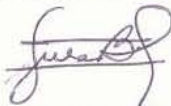
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 19 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio de la proteína de unión a caja TATA 1 de *Taenia solium* (TsTBP1)**", dirigida por el Dr. Abraham Landa Piedra.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

|            |                                 |
|------------|---------------------------------|
| PRESIDENTE | Dra. Edda Lydia Sciutto Conde   |
| VOCAL      | Dr. Roberto Hernández Fernández |
| VOCAL      | Dr. Horacio Reyes Vivas         |
| VOCAL      | Dr. Luis Servín González        |
| SECRETARIO | Dra. Leticia Moreno Fierros     |

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, D.F., a 21 de octubre de 2015**  
**COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO**



**DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**

C.c.p. Tutor  
C.c.p. Archivo

BGP\*Igg

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. Para este trabajo se contó con la asesoría como Comité Tutor de la Dra. Alicia González Manjarrez y el Dr. Ángel Zarain Herzberg.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 176925 y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN215714.

El autor del trabajo recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, con el número de becario 240037.

Asimismo, el autor recibió apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado para la asistencia a Congresos Nacionales e Internacionales.

**Dedicada a Laura...**

**Nada de esto sería posible sin ti.**

## **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación que me ha brindado a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Abraham Landa por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todas las enseñanzas brindadas a lo largo de este tiempo.

A mi Comité Tutor de Maestría: la Dra. Alicia González Manjarrez y el Dr. Ángel Zarain Herzberg, por todos los consejos y comentario para este proyecto.

A mi esposa Laura, por todo este tiempo a mi lado, por consentirme tanto y por animarme a dar siempre lo mejor de mí.

A mis padres: Violeta y Liborio, por seguir impulsándome en la vida, por los ánimos que me dan a diario y por qué siempre han estado conmigo cuando más los he necesitado.

A mis hermanos, David y Daniel, por ser las personas más geniales que conozco.

A mi Tía Rocío, porque sé que dondequiera que estés... me estas cuidando.

A los grandes amigos que tuve el placer de conocer en esta nuestra Universidad: Cecilia, Claudia, David, Goretti, Mariana, Marisol, Mercedes, Ricardo, Roberto, Rolando, Sara, Zaine.

A Jonathan por quien sabe ya cuántos años de ser amigos.

A mis queridos compañeros de laboratorio, que, aunque algunos de ustedes ya no están, se les recuerda con cariño: Alicia, Anayetzin, Aramís, Areli, Felipe, Julián, Lucia, Magda, Marco, Narda, Odín, Omar, Ponciano, Richie, Sergio, Vera, Víctor, Viri.

# Índice.

| Contenido                                  | Página |
|--------------------------------------------|--------|
| Abreviaturas                               | 1      |
| Resumen                                    | 3      |
| Abstract                                   | 5      |
| Introducción                               | 7      |
| Taeniosis / Cisticercosis                  | 7      |
| <i>Taenia solium</i> .                     | 8      |
| Ciclo de vida.                             | 10     |
| Epidemiología.                             | 11     |
| Diagnóstico.                               | 12     |
| Tratamiento.                               | 13     |
| Transcripción y polimerasas.               | 14     |
| Estructura de un promotor proximal.        | 14     |
| Preinicio de la Transcripción.             | 15     |
| Proteína de unión a caja TATA.             | 16     |
| Transcripción en el género <i>Taenia</i> . | 17     |
| Hipótesis                                  | 19     |
| Objetivo general                           | 19     |
| Objetivos Particulares                     | 19     |
| Material y Métodos                         | 20     |
| Resultados                                 | 25     |
| Discusión                                  | 48     |
| Conclusiones                               | 53     |
| Referencias                                | 54     |
| Anexos                                     | 62     |

## Abreviaturas.

|                      |                                                                                 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 5'-RACE              | Amplificación rápida de los extremos 5' de DNAC                                 |
| aa                   | Aminoácidos                                                                     |
| Anti-pTsTBP1-C       | Anticuerpo contra el dominio Carboxilo terminal de TBP1 de <i>Taenia solium</i> |
| Anti-pTsTBP1-N       | Anticuerpo contra el dominio Amino terminal de TBP1 de <i>Taenia solium</i>     |
| BRE                  | Elemento de reconocimiento del Factor de Transcripción IIB                      |
| COOH-ter             | Dominio Carboxilo terminal                                                      |
| DNAC                 | Ácido desoxirribonucleico complementario                                        |
| DNAG                 | Ácido desoxirribonucleico genómico                                              |
| DAPI                 | 4,6'-diamino-2 fenilindol                                                       |
| DPE                  | Elemento promotor río abajo                                                     |
| EgTBP1               | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Echinococcus granulosus</i>               |
| EMSA                 | Ensayo de retardo de la movilidad electroforética                               |
| EmTBP1               | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Echinococcus multilocularis</i>           |
| HsTBP1               | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Homo sapiens</i>                          |
| Inr                  | Secuencia Iniciadora de la Transcripción                                        |
| NC                   | Neurocisticercosis                                                              |
| NH <sub>2</sub> -ter | Dominio Amino terminal                                                          |
| OMS                  | Organización Mundial de la Salud                                                |
| pAT5                 | Gen que codifica para la Actina 5 de <i>Taenia solium</i>                       |
| pAT6                 | Gen que codifica para la Actina 6 de <i>Taenia solium</i>                       |
| PBS                  | Amortiguador salino de fosfatos                                                 |
| PIC                  | Complejo de pre-inicio de la Transcripción                                      |
| RMSD                 | Promedio de la desviación cuadrada mínima                                       |
| RNAPol               | Polimerasa de ácido ribonucleico                                                |
| ScTBP1               | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>              |
| SNC                  | Sistema Nervioso Central                                                        |
| SsTBP1               | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Sus scrofa</i>                            |
| T/C                  | Taeniosis/Cisticercosis                                                         |

|            |                                                                              |
|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| TBP        | Proteína de unión a caja TATA                                                |
| TF         | Factores de Transcripción                                                    |
| Ts2CysPrx  | Gen que codifica para la Peroxiredoxina 2 Cys típica                         |
| TsCu/ZnSOD | Gen que codifica para la Super óxido dismutasa de <i>Taenia solium</i>       |
| TSS        | Sitio de Inicio de la Transcripción                                          |
| TsTAF6     | Factor Asociado a la Proteína de unión a caja TATA 6 de <i>Taenia solium</i> |
| TsTBP1     | Proteína de unión a caja TATA 1 de <i>Taenia solium</i>                      |

## Resumen.

La Proteína de unión a Caja TATA (TBP) es un factor de transcripción esencial tanto para los genes que contienen la caja TATA, como los que no la contienen. En este trabajo se clonó y caracterizó un DNS complementario (DNAC) que codifica para una TBP1 de *Taenia solium* (TsTBP1) que consta de 238 aminoácidos con un peso molecular predictivo de 26.7 kDa y un pI teórico de 10.6. El dominio amino terminal (NH<sub>2</sub>-ter) no muestra conservación cuando se compara con las TBP1 de humano y cerdo (hospederos de *T. solium*). En contraste, el dominio carboxilo terminal (COOH-ter) está altamente conservado entre los organismos y muestra una alta identidad con la TBP1 de tenidos, además presenta los aminoácidos involucrados en la interacción con la caja TATA, así como con los factores de transcripción TFIIA, TFIIB, NC2 y TAF1. El modelado *in silico* de su COOH-ter muestra la clásica estructura de “silla de montar” de la familia de las TBP, mostrando una  $\alpha$  hélice adicional al final del dominio, no presente en las TBP1 de humano y cerdo. La TsTBP1 nativa fue detectada en extractos nucleares y núcleos de la pared vesicular de cisticercos usando anticuerpos generados contra dos péptidos sintéticos localizados uno contra el NH<sub>2</sub>-ter (anti-TsTBP1-N) y el otro contra el COOH-ter (anti-TsTBP1-C) de la TsTBP1. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) mostraron bandas de retardo cuando la caja TATA de los promotores de los genes de Actina 5 (pAT5) y de la 2Cys-Peroxiredoxina (Ts2CysPrx) de *T. solium*, fueron enfrentadas contra extractos nucleares, se comprobó que dicho retardo fue debido a la TsTBP1, además un súper retardo fue obtenido usando el anticuerpo anti-TsTBP1-NH<sub>2</sub>. Adicionalmente, el anticuerpo anti-TsTBP1-COOH inhibió la unión de la TBP1 a la caja TATA de pAT5.

También se aisló el gen que codifica para TsTBP1, el cual presenta un tamaño de 1481 pb con cinco exones interrumpidos por cuatro intrones, su región promotora proximal consta de 238 pb y en ella se identificaron los sitios de unión para NF1, AP-1, YY1, TAF1/TAF2 y TAF6/TAF9, el sitio de inicio de la transcripción del gen es una adenina (A<sub>+1</sub>). Los ensayos de Southern y northern blot mostraron que TsTBP1 es codificado por un solo gen. Su promotor carece de caja TATA, pero contiene un sitio DPE que mostró interacción con TsTAF6, el cual está presente en los núcleos de cisticercos. Finalmente, mediante un análisis tipo clustal con secuencias de promotores mínimos con varios genes de céstodos, nos permitió la identificación de elementos como la caja TATA, Inr, y DPE.

## Abstract.

TATA-box binding protein (TBP) is an essential regulatory transcription factor for the TATA-box and TATA-box-less gene promoters. We report the cloning and characterization of a full-length cDNA that encodes a *Taenia solium* TATA-box binding protein 1 (TsTBP1). Deduced amino acid composition from its nucleotide sequence revealed that encodes a protein of 238 residues with a predicted molecular weight of 26.7 kDa, and a theoretical pI of 10.6. The NH<sub>2</sub>-terminal domain shows no conservation when compared with to pig and human TBP1s. However, it shows high conservation in size and amino acid identity with taeniids TBP1s. In contrast, the TsTBP1 COOH-terminal domain is highly conserved among organisms, and contains the amino acids involved in interactions with the TATA-box, as well as with TFIIA and TFIIB. *In silico* TsTBP1 modeling reveals that the COOH-terminal domain forms the classical saddle structure of the TBP family, with one  $\alpha$ -helix at the end, not present in pig and human. Native TsTBP1 was detected in *T. solium* cysticerci's nuclear extract by western blot using rabbit antibodies generated against two synthetic peptides located in the NH<sub>2</sub> and COOH-terminal domains of TsTBP1. These antibodies, through immunofluorescence technique, identified the TBP1 in the nucleus of cells that form the bladder wall of cysticerci of *Taenia crassiceps*, an organism close related to *T. solium*. Electrophoretic mobility shift assays using nuclear extracts from *T. solium* cysticerci and antibodies against the NH<sub>2</sub>-terminal domain of TsTBP1 showed the interaction of native TsTBP1 with the TATA-box present in *T. solium* actin 5 (pAT5) and 2-Cys peroxiredoxin (Ts2-CysPrx) gene promoters; in contrast, when antibodies against the anti-COOH-terminal domain of TsTBP1 were used, they inhibited the binding of TsTBP1 to the TATA-box of the pAT5 promoter gene.

We have to isolate and analyzed the gene encoding a *T. solium* TATA binding protein 1 (TsTBP1). It spans 1481 bp and its coding region is interrupted by four introns; moreover, it produces a protein of 238 amino acids residues. The core promoter region gen was ~238 bp, on it, we identified a putative binding site for NF1, AP-1, YY1, TAF1/TAF2 and TAF6/TAF9 and the TSS that corresponds to an A<sub>+1</sub>. Southern and northern blot analysis showed that TsTBP1 is coding for a single gene that produce two messengers. Moreover, two putative TATA box were identified in -97 and -69 (relatives to TSS), but EMSA experiments showed anyone component of cysticerci nuclear extracts bound them; suggesting TsTBP1

gen is a TATA-less. On the other hand, DPE was identified and we shows that TsTAF6 is capable to bind. We identified TAF6 by confocal microscopy in *T. crassiceps* cysticerci; found the nucleotide and amino acid sequence and construct a molecular model for this transcription factor. Finally, analysis of alignment from the core promoter of *Taeniid* genes showed TATA-box and DPE element are similar to the mammalian, not so the Inr, where the most stable nucleotide corresponds to the A<sub>+1</sub>.

## **Introducción.**

### **Taeniosis / Cisticercosis.**

El origen de la taeniosis/cisticercosis (T/C) en los humanos se remonta a miles de años, muy probablemente en África, en donde el hombre primitivo, comía los desperdicios de otros carnívoros. Este tipo de alimentación y la aparición del canibalismo, hicieron que esta enfermedad se estableciera en humanos. La T/C como la conocemos hoy en día en el hombre, es debido a los deficientes métodos de crianza de los hospederos intermediarios (cerdo/res) y a la falta de educación e higiene (Larralde C. y De Aluja A., 2008).

La T/C son infecciones producidas por los helmintos de la familia Taeniidae. Existen dos especies que causan la taeniosis en los humanos: la *Taenia solium* y la *Taenia saginata*. El hombre es el único hospedero definitivo para ambas taenias (Sarti E., 1997). Por otro lado, el agente causal de la cisticercosis humana y porcina, es el metacéstodo o cisticerco o larva de *T. solium*. El humano adquiere la enfermedad por la ingesta de huevos que produce el adulto de este parásito. El adulto vive en el intestino delgado del hombre y produce huevos que son liberados en la materia fecal, los que por malas prácticas higiénicas pueden contaminar alimentos y agua potable. Asimismo, un portador del parásito adulto puede auto infectarse y adquirir la cisticercosis por el sistema conocido como ano-mano-boca o infectar a la gente que convive con él (García H. et al., 2003).

La neurocisticercosis (NC) es la forma más grave de esta enfermedad. Es causada por el alojamiento de cisticercos en el Sistema Nervioso Central (SNC). La infección puede desde no causar síntomas (incluso hasta la muerte del paciente). Estos síntomas son muy variables e incluye mareos, dolores de cabeza e hidrocefalia, y dependen del número, localización y viabilidad de los cisticercos (Hancock K., et al., 2003). Varios estudios han mostrado que en países donde es endémica esta enfermedad, del 18 al 50% de los casos presentan ataques de epilepsia (Medina M., et al., 1990), siendo éste uno de los principales síntomas por los cuales se llega al diagnóstico de la NC. Se estima que en América Latina existen alrededor de 400,000 casos de NC asintomática y mucha más gente con riesgo de ser infectada (Bern C., et al., 1999).

Por otro lado, debido a que la taeniosis por lo general sigue un curso benigno, y a la falta de métodos diagnósticos poco sensible, hace que la detección de esta enfermedad sea muy baja.

La T/C en México causada por *T. solium* es de gran importancia, debido a la alta prevalencia de estos padecimientos, no sólo en zonas rurales, si no, en todos aquellos lugares donde la higiene en los alimentos no es la adecuada, las condiciones sanitarias son pobres y donde la crianza de cerdos es en traspatio.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) no considera a la cisticercosis como una de las principales enfermedades epidemiológicas causantes de muerte en el mundo (OMS, 2009). Sin embargo, la NC es una enfermedad que incapacita al individuo, por lo que se invierte una gran cantidad de dinero en estos pacientes (Flisser A., 1988). La T/C nos sólo es prevalente en México sino también en países pobres de África, Asia y América Latina, especialmente en áreas urbanas y rurales que carecen de infraestructura sanitaria (Meza y Aguilar, 2002). Los grupos dedicados al estudio de este parásito han tratado de encontrar formas para eliminarlo, y a pesar de que se han realizado avances significativos como una vacuna y existen antihelmínticos eficaces, aun no se ha encontrado un método eficaz para su eliminación.

### ***Taenia solium.***

Carlos Linneo clasificó e incluyó a la *T. solium* en la décima edición de su *Systema Naturae* en 1758. Actualmente este organismo se clasifica de la siguiente manera:

Reino:      Animalia

Filo:        Platelmintos

Clase:       Céstoda

Orden:      Cyclophyllidea

Familia:    Taeniidae

Género:     *Taenia*

Especie:    *Solium*

Este parásito también es conocido como “solitaria”, y en su forma adulta presenta un cuerpo largo, aplanado, segmentado de color blanquecino. Generalmente supera los dos metros de largo y se han reportado casos donde llega a medir hasta 8 metros (Herrera L., et al., 1999). Se aloja en el intestino delgado del hombre, fijándose través del rostelo compuesto por una doble corona de ganchos y ventosas contenidos en su escólex que tiene el tamaño de un alfiler (Figura 1).

El cuerpo del gusano adulto, llamado estróbilo, está recubierto por el tegumento o epitelio, que le permite absorber los nutrientes del medio en el que habita. El estróbilo está compuesto de segmentos o proglótidos que parten del cuello unido al escólex. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, es decir, no han desarrollado los órganos sexuales. Los proglótidos maduros se encuentran en la parte media del estróbilo y presentan sus órganos sexuales diferenciados. Cada proglótido maduro posee genitales masculinos y femeninos, debido a que este parásito es hermafrodita, haciendo de cada uno de estos segmentos una verdadera unidad de reproducción (Flisser A., et al., 2006a). Los segmentos más alejados del estróbilo se conocen como proglótidos grávidos, los cuales presentan ramas uterinas llenas de huevos; generalmente estos proglótidos se desprenden del estróbilo y son liberados en las heces. Aproximadamente cada proglótido grávido contiene alrededor de 50,000 huevos los cuales son evacuados en las heces (Flisser A., et al., 2006b).

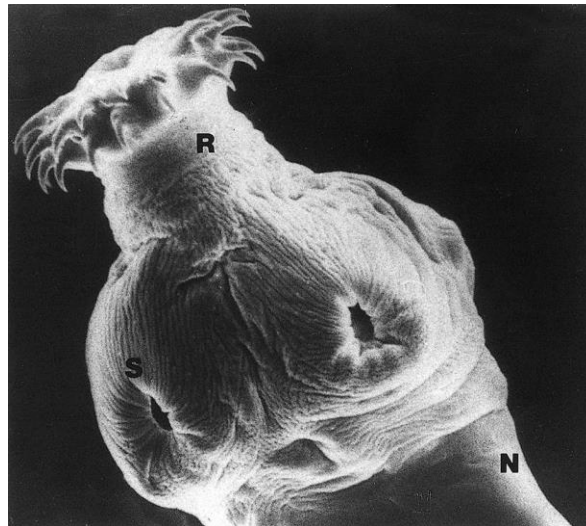


Figura 1. Micrografía electrónica del escólex del parásito adulto de *Taenia solium*, en el cual se puede observar el rostelo (R), con su doble corona de ganchos; ventosas (S) y el cuello (N) (Tomada de Sciutto E., et al., 2000).

Los huevos (Figura 2A) son esféricos y presentan una apariencia radial (al microscopio óptico), en su interior contienen una oncósfera o embrión con seis ganchos (hexacanto); la capa principal que protege a la oncósfera es el embrióforo. Este último está constituido por bloques de una proteína similar a la queratina, la que es muy resistente e impermeable, la cual hace posible soportar el medio presente en el estómago y medio ambiente. Los bloques proteicos están unidos por una sustancia sensible a la digestión enzimática por los jugos gástricos y a la acción de las sales biliares del intestino lo que permite la liberación de la oncósfera.

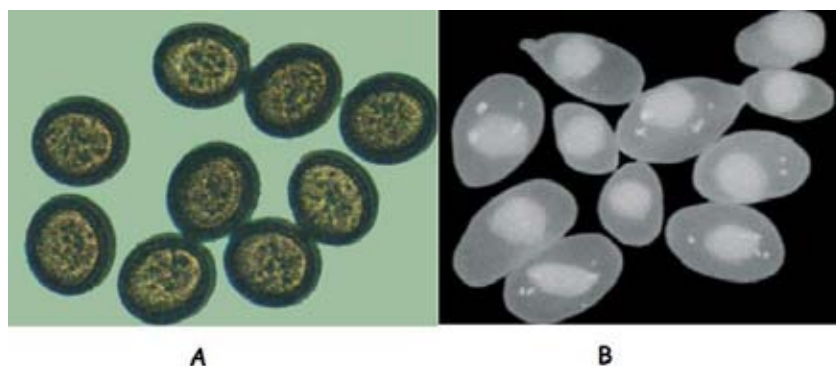


Figura 2. Fotografía tomada a través de microscopio óptico de: (A) huevos y (B) cisticercos de *Taenia solium* (Tomada de Flisser A., et al., 2006a).

El cisticerco (Figura 2B) es una vesícula ovalada y translúcida, de 0.5 a 2 centímetros de diámetro, dotada de un pequeño escólex en su interior, que al igual que en el parásito adulto posee una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. También está dotada de un tegumento que permite la absorción de los nutrientes del hospedero necesarios para su desarrollo.

### **Ciclo de vida.**

La *T. solium* adulta (Figura 3) habita en el intestino delgado del humano en donde constantemente produce huevos que se expulsan en la materia fecal. El cerdo se infecta al ingerir estas heces. Cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco ocasionando la cisticercosis porcina. Una vez que los huevos se encuentran en el tracto digestivo del cerdo, las enzimas proteolíticas y las sales biliares producen la activación de la oncósfera o embrión hexacanto. La oncósfera activada penetra la pared intestinal del

hospedero intermediario, alcanzando los capilares sanguíneos y linfáticos que lo distribuyen a varios órganos y tejidos. Se requieren al menos 10 semanas para que éste se pueda convertir en cisticerco y ser capaz de vivir por varios años en el hospedero (Villalobos-Perozo R., 2003).

El ciclo de este parásito se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida infectada con cisticercos, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares participan en la activación y evaginación del cisticerco, el cual con su escólex se fija a la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece, madura y se diferencia hasta convertirse en un gusano adulto. La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto, puede ocasionar la ingestión de huevos, produciendo cisticercosis en los humanos y cerdos (Willms K., et al., 2008).

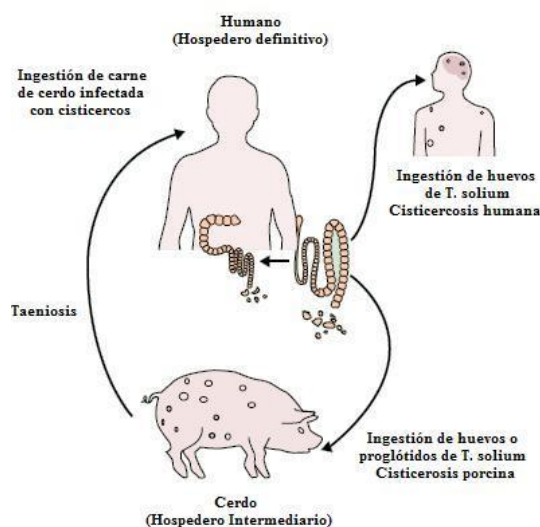


Figura 3. Ciclo de vida de *T. solium*. El humano es el hospedero definitivo que adquiere la taeniosis por ingestión de cisticercos presentes en la carne de cerdo, que se desarrolla al adulto en el intestino delgado, produce huevos que causan la cisticercosis porcina (hospedero intermediario) o cisticercosis humana (hospedero accidental) (Tomada de García H., et al., 2003).

## Epidemiología.

La cisticercosis es una enfermedad endémica en América Latina, África y Asia, donde la NC es la infección parasitaria del SNC más común (Sloan L., et al., 1995). En años recientes se ha observado un incremento en los casos de NC en países de primer mundo, debido al aumento en la cantidad de migrantes hacia éstos (Kaminsky R., 1991).

La NC humana en México fue reportada por primera vez en 1901, por el Dr. Ignacio Gómez Izquierdo (Flisser A. y Gyorkos T., 2007), quien describió el caso de un paciente proveniente de Cuba que murió en un hospital psiquiátrico con un diagnóstico de alcoholismo o tuberculosis. Los análisis de autopsia realizados al cuerpo del paciente revelaron la presencia de un cisticerco en el cerebro.

En México, por medio de estudios hospitalarios se reporta una tasa de hasta 8.6 por 100 hospitalizados, y en las necropsias se han encontrado hasta 2453 por cada 100 000 habitantes; se señala que el 43.3% de los casos eran asintomáticos y el 80% fue un hallazgo de necropsia (Sarti E., 1992). Las estadísticas oficiales muestran un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100 000 habitantes (Correa M., et al., 1994). Desde el año de 1990 hasta el año 2005 la disminución de la incidencia de taeniosis ha sido considerable, ya que en 1990 se tenía un reporte nacional de 14013 casos de taeniosis y 586 casos de cisticercosis, y en el 2005 fue de 393 casos de taeniosis y 306 de cisticercosis (SSA, México 2007).

Uno de los estudios de epidemiología basado en serología realizado en la República Mexicana (Larralde C., et al., 1992) mostró que la prevalencia de la cisticercosis va desde un 0.06% hasta un 2.97%, con un promedio nacional de 1.2%. Asimismo, se encontró que hay una mayor prevalencia en zonas rurales con respecto a las zonas urbanas; y el porcentaje incrementa de acuerdo al nivel socioeconómico (clase baja > clase media > clase alta).

Los últimos estudios realizados en el estado de Morelos revelan una prevalencia de la cisticercosis porcina (Morales et al., 2006) de hasta el 26% en ciertas regiones, las cuales anteriormente se habían analizado y se había observado prevalencia de pacientes con el parásito adulto (Sarti E., 1992). Esto nos muestra que el problema sigue siendo un reto en nuestro país.

### **Diagnóstico.**

Clásicamente la taeniosis ha sido detectada por exámenes coproparasitológicos. Estos métodos de detección son muy inespecíficos y se basan en la observación microscópica de huevos o proglótidos (Wilkins P., et al., 1999). El examen directo de huevos es inútil y se requieren exámenes de tinción de proglótidos, para poder observar el número de ramas uterinas; en donde *T. solium* posee de 7 a 13 ramas laterales y *T. saginata* presenta de 15 a 20. Recientemente se han desarrollado ensayos de detección de copro antígenos, los cuales

han incrementado la sensibilidad en la detección de casos de taeniosis. Este tipo de ensayos utilizan sueros híper inmunes de conejo en contra de extractos crudos de adultos, acoplados a un ensayo ELISA; aquí se detectan antígenos del parásito, presentes en las heces. Estas pruebas han demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad para *Taenia sp.* Una de las desventajas es que este ensayo es incapaz de distinguir entre *T. solium* y *T. saginata* (Allan J., et al., 2003).

El diagnóstico de la cisticercosis se basa en los hallazgos clínicos, epidemiológicos y/o serológicos. Los estudios de resonancia magnética y las tomografías axiales computarizadas son las herramientas más sensibles y específicas (Sloan L., et al., 1995), pero no son muy utilizadas, debido a su alto costo. Actualmente, el único método funcional para el diagnóstico de cisticercosis en un laboratorio, es la detección serológica de anticuerpos en contra del cisticerco, en especial la inmunoelectrotransferencia que utiliza como antígenos las glicoproteínas descritas por Tsang (Tsang V., et al., 1989; Hancock K., et al., 2004).

Sin embargo, estudios recientes muestran mediante un estudio comparativo que la técnica contra glicoproteínas no difiere significativamente de la técnica de ELISA (Michelet et al., 2011). Lo cual hace que las investigaciones actuales se centren en la búsqueda de nuevas moléculas candidatas a dar un diagnóstico más contundente y con alta especificidad y sensibilidad (Vaca-Paniagua et al., 2008).

### **Tratamiento.**

El medicamento de elección hasta hace varios años para la taeniosis era la niclosamida que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. No tiene acción contra los huevos ni los cisticercos. Su uso trajo gran polémica, debido a que se pone en riesgo al paciente de contraer cisticercosis, pues destruye a los proglótidos y libera a los huevos dentro de la luz intestinal. Estas razones, aunadas al costo del medicamento, hicieron que éste quedara en desuso (Herrera L., et al., 1999).

El prazicuantel fue muy usada en nuestro país después del desuso de la niclosamida. Es especialmente efectivo contra las formas larvarias de céstodos pero también contra el parásito adulto de la *T. solium*. Su mecanismo de acción es que lesiona y hace permeable el tegumento

del parásito adulto y de la larva debido a que interfiere con los canales de calcio (Pearson R. y Guerrant R., 1983; King C. y Mahmoud A., 1989).

El albendazol es la droga de elección en la actualidad, sobre todo en los menores de cinco años de edad. Tiene la ventaja de que no sólo actúa contra las larvas y adultos de la *T. solium*, sino también contra la mayoría de helmintos y nemátodos (Sarti E., 1997). El mecanismo de acción de este medicamento es como el de todos los bencimidazoles, modifica el metabolismo de los carbohidratos, mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa (Prichard R., 1973), e impide la captación de glucosa causando la disminución de las reservas de glucógeno (Lacey E., 1988). Asimismo, inhibe la secreción de acetil colinesterasa y la polimerización de los microtúbulos.

### **Transcripción y polimerasas.**

En eucariontes, la transcripción es realizada por tres RNA Polimerasas (RNAPol): I, II y III. La RNAPol I se encarga de la transcripción de los genes ribosomales (RNAr); la RNAPol II de los genes que codifican para proteínas (RNAm), así como para los genes de los RNA nucleares pequeños (RNAsn), y la RNAPol III para los genes del RNA de transferencia (RNAt), el RNAr 5S y otros RNAsn. Este proceso representa un paso crucial en el flujo de la información en la célula.

El proceso de la Transcripción de los genes que codifican para proteínas se divide en tres momentos importantes: El inicio, la elongación y la terminación (Figura 5). La iniciación consiste en el reconocimiento de la secuencia iniciadora por parte de la RNAPol II y la formación de los productos abortivos antes de la elongación de la cadena. Para que la iniciación se lleve a cabo es necesario el reclutamiento de una serie de factores de Transcripción (TF) en el promotor proximal del gen. Esto es conocido como el Pre-inicio de la Transcripción.

### **Estructura de un promotor proximal.**

En el promotor proximal es donde se coloca la maquinaria requerida para que la RNAPol II pueda activarse. Existen ciertas secuencias de ADN que ya han sido identificado que interaccionan con los TF's. Estas secuencias son la caja TATA, el elemento de reconocimiento del TF IIB (BRE), la secuencia iniciadora (Inr), el elemento de promotor corriente abajo (DPE). Además, se sabe que no es necesaria la presencia de todos estos elementos para que la transcripción inicie.

La caja TATA es el sitio de unión al DNA de la proteína de unión a caja TATA (TBP). Este fue el primer elemento del promotor mínimo en ser identificado. Fue descubierto en las secuencias de los genes que codifican histonas de *Drosophila* (Goldberg M. L., 1979). Dicha caja se encuentra típicamente de -25 a -30 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción y tiene la secuencia consenso TATAAAA (Chalkey G. y Verrijzer P., 1999; Juo Z., et al., 1996). Estudios recientes *in silico* sugieren que la caja TATA está presente en aproximadamente el 10–15% de los promotores mínimos de los genes del humano (Juven-Gershon T., et al., 2006).

El Inr abarca el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Se ha encontrado en promotores mínimos que incluyen la caja TATA y los que no la incluyen también. La secuencia consenso para el Inr en células de mamífero es Py-Py-A<sub>+1</sub>-N-T/A-Py-Py. En donde A<sub>+1</sub> corresponde generalmente al sitio de inicio de transcripción (TSS) (Butler J. E. F. and Kadonaga J. T., 2002).

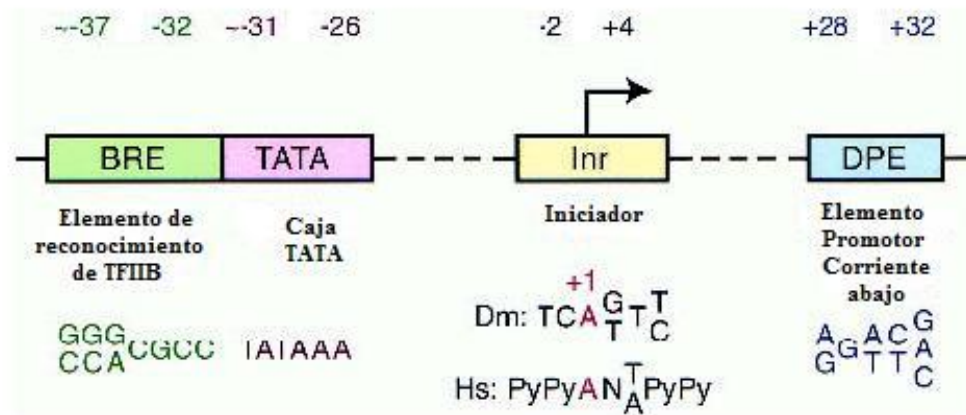


Figura 4. Elementos del promotor mínimo y sus secuencias consenso. Los números de arriba en la figura representan las posiciones de dichos elementos respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Py: Pirimidinas, N: cualquier base, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*. Modificado de Butler J. E. F. and Kadonaga J. T., 2002.

El DPE es un elemento corriente abajo que es requerido para la unión del TFIID en un subconjunto de promotores sin caja TATA. Se localiza en +28 a +32 relativos al TSS, presenta una secuencia consenso de A/G-G-A/T-C/T-G/A/C (Kadonaga J. T., 2002).

El BRE se encuentra inmediatamente corriente arriba de la caja TATA y presenta una secuencia consenso de 7 pares de bases: G/C-G/C-G/A-C-G-C-C. Este motivo no se encuentra en levaduras ni plantas, lo cual sugiere que este elemento no contribuye a la regulación en estos organismos (Smale. S. T. and Kadonaga J. T., 2003) (Figura 4).

### Preinicio de la Transcripción.

Estudios *in vitro* han mostrado que el inicio de la transcripción por la RNAPol II requiere de los factores basales de transcripción: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Sikorski T.W. and Buratowski S., 2009). El complejo que se forma de este reclutamiento de factores es conocido como el Complejo de pre-inicio (PIC). En primer lugar se une la TBP a la caja

TATA. Esto promueve el reclutamiento de los TFIIA y TFIIB. Un complejo formado por la RNAPol II y el TFIIF reconocen el sitio y se unen. Por último, la unión de TFIIE y IIH dan lugar a un complejo cerrado inactivo (Figura 5). El TFIIH con su actividad de cinasa, fosforila al dominio carboxilo terminal (COOH-ter) en la Ser<sup>2</sup> de la RNAPol II y promueve la apertura del complejo para dar inicio a la transcripción del gene en cuestión (Hernández N., 1993).

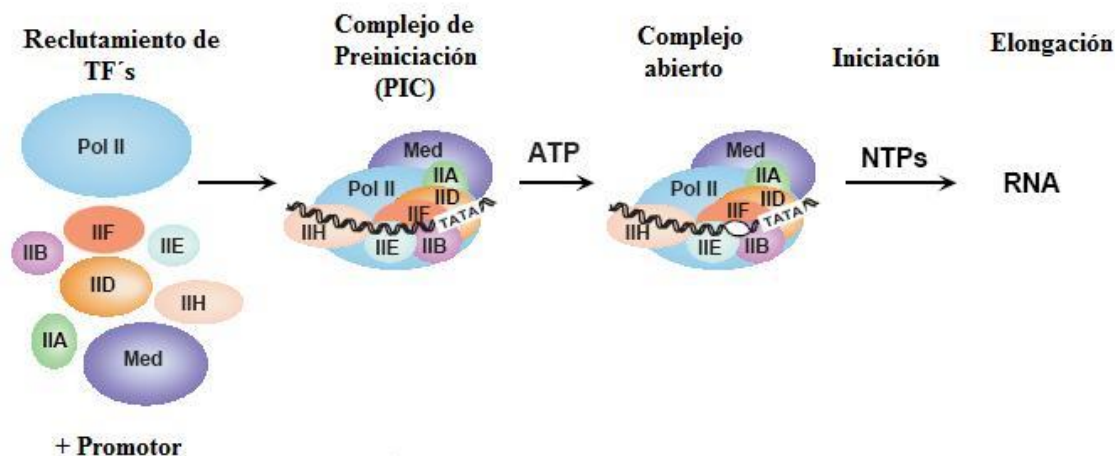


Figura 5. Pasos secuenciales para la formación del PIC, el inicio y la elongación de la transcripción. Modificado de Hahn S., 2004.

### Proteína de unión a caja TATA (TBP).

La TBP es una proteína de 26-40 kDa, con una estructura de “silla de montar” (Figura 6), con dimensiones aproximadas de 32 Å x 45 Å x 60 Å (Nikolov D. y Burley S., 1994). TBP está compuesta por una estructura simétrica de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ , con dos dominios estructurales de entre 89 a 90 aminoácidos (aa), los cuales conforman el COOH-ter altamente conservado (180 aa aproximadamente con un 80% de conservación), y por un dominio amino-terminal (NH<sub>2</sub>-ter) flexible, pero muy variable entre especies que comprende desde 18 a 159 aminoácidos (aa), como la TBP de *Arabidopsis thaliana* y el humano, respectivamente (Heard D., et al., 1993).

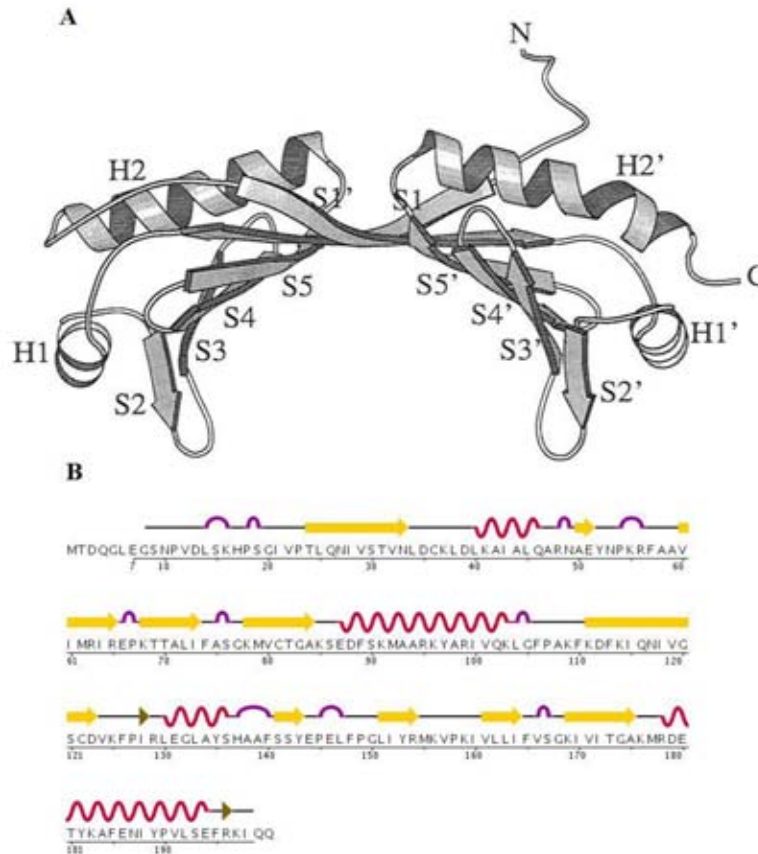


Figura 6. Estructura de la proteína de unión a caja TATA (TBP) de *A. thaliana*. (A) Muestra la estructura terciaria con sus dos dominios: el dominio cóncavo, con el cual se produce la unión al DNA y el dominio convexo, que sirve para interaccionar con otros factores. Se aprecia la conformación de “silla de montar”, las 10 láminas  $\beta$  (S) y las 4 hélices  $\alpha$  (H). (B) Muestra la estructura primaria de la TBP, señalando sobre los aminoácidos la estructura secundaria que forman. Modificada de Davidson I., 2003; y de Protein Data Bank: 1VOK.

La cara cóncava de la estructura de “silla de montar” consiste en diez láminas  $\beta$  anti-paralelas, altamente curvadas, en las cuales se localizan todos los aa implicados en la unión al DNA. La cara convexa, está conformada por cuatro hélices  $\alpha$ -anfipáticas, que contienen residuos importantes para la interacción con otros factores de transcripción (Kim J. y Burley S., 1994).

### Transcripción en el género *Taenia*.

En este género la transcripción no ha sido estudiada. Existen sólo algunos genes secuenciados reportados donde se ha determinado computacionalmente algunos de los elementos del promotor proximal. Se conocen las secuencias de los genes de dos actinas, pAT5 y pAT6 (Campos A. et al., 1990), de la paramiosina (Vargas-Parada L. y Laclette J.P., 2003) de *T.*

*solium*; la secuencia del gen de la 2-Cys Peroxirredoxina típica tanto de *T. solium* como de *T. crassiceps* (Vaca-Paniagua F. et. al., 2009). En la Figura 7, se muestra el alineamiento de las secuencias promotores proximales conocidas hasta la fecha en el género *Taenia*. Se puede observar que la A de la secuencia iniciadora (Inr) se conserva en todas ellas y está a una distancia que va entre 23 y 44 pb con respecto al ATG de inicio de la traducción. Asimismo, se observa que la caja TATA de todas ellas no concuerda con la secuencia consenso, pero contiene el motivo de 4pb (TATA) que le da su nombre y se encuentra a una distancia entre -30 y -33 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

|              |     | <b>TATA</b>                                                                                         | <b>Inr</b> |    |
|--------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----|
| <b>pAT5</b>  | -30 | <b>TATATAAA</b> CCGTGGGTCTTCAAGCATCG <b>GCAACTT</b> ACGACTTGTGCTGTATCTGTATCGGCTGTCTGCAAC <b>ATG</b> |            | 44 |
| <b>pAT6</b>  | -31 | <b>TATAAGAA</b> GCGCTTGGTGGGACACCAGTGG <b>GCACACT</b> TGTCCAAGGCCAGCAGT <b>ATG</b>                  |            | 25 |
| <b>TsPrx</b> | -30 | <b>TATATTT</b> GGCGGTAAGAGCTGTGCGTGG <b>TGAATTC</b> CATTGTTTGCCTGTA <b>ATG</b>                      |            | 23 |
| <b>TcPrx</b> | -33 | <b>TATATTT</b> GGCGGTAAAGGACGCTGTGGCTGT <b>TGAATCC</b> CATTGTCTGCTCGCGTTCAGT <b>GATG</b>            |            | 30 |

Figura 7. Alineamiento de los promotores mínimos de *Taenia* reportados. pAT5 y pAT6 que corresponden a genes de Actina; Ts2-CysPrx que corresponde al gen de la 2-Cys Peroxirredoxina de *T. solium*; y Tc2-CysPrx corresponde al gen de la 2-Cys Peroxirredoxina de *T. crassiceps*. Modificado de Vaca-Paniagua F. et. al., 2009.

Experimentos preliminares realizados en un ensayo de retardamiento con proteínas nucleares de *T. solium* mostraron que cuando se utiliza una sonda de DNA que contiene la caja TATA putativa del promotor proximal del gen para la Ts2CysPrx, se observa una banda de retardo; sugiriendo que hay unión de proteínas nucleares al promotor (Vaca-Paniagua F, 2009).

# Hipótesis

La TBP es una proteína esencial para el pre-inicio de la transcripción presente en *Taenia solium*; la cual es capaz de interactuar con las cajas TATA de los promotores proximales de los genes pAT5 y 2Cys-Prx de *Taenia solium*.

## Objetivo general.

- ✓ Identificar y caracterizar la proteína de unión a caja TATA 1 de *Taenia solium* (TsTBP1) y estudiar su unión a promotores de los genes pAT5 y Ts2CysPrx

## Objetivos Particulares.

- ❖ Aislamiento y caracterización del DNAC que codifica para TsTBP1
- ❖ Modelado molecular de la TBP1 y análisis de su iso superficie.
- ❖ Identificación de TsTBP1 mediante WB en extractos nucleares.
- ❖ Identificación de TBP1 en núcleos de tejido de la pared vesicular de cisticercos
- ❖ Aislamiento y caracterización del gen que codifica para TsTBP1.
- ❖ Análisis del promotor del gen para la TsTBP1.
- ❖ Ensayos de retardamiento y súper retardamiento sobre los promotores.

## **Material y métodos.**

### **Material biológico.**

Los cisticercos de *T. solium* fueron disectados del músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados, obtenidos de una comunidad rural del estado de Morelos. Los cisticercos de *T. crassiceps* WFU fueron obtenidos de ratones infectados experimentalmente, ratones hembra de la cepa BALB/cJ de seis semanas de edad que fueron infectados con 10 cisticercos WFU en la cavidad peritoneal usando una aguja 20G y sacrificados 90 días después de la inoculación (Everhart et al, 2004). Los cisticercos obtenidos fueron lavados cuatro veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) frío y estéril. Los parásitos adultos de *T. solium* fueron obtenidos del intestino delgado de hámsteres infectados experimentalmente con 10 cisticercos, como se ha reportado previamente (Ochoa-Sánchez A., et al., 2011).

Los animales fueron sacrificados usando pentobarbital i.v. (210mg/kg), de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999 para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio; dicho protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (007-2012).

### **Clonación del DNAc de TsTBP1.**

Una sonda de TsTBP1 fue generada con el estuche Super Script One Step RT-PCR (Invitrogen, Carlsbag, CA), usando 1 µg de RNA total de cisticerco de *T. solium* y oligonucleótidos diseñados en dos zonas altamente conservadas en TBPs (TBP5': 5'-CGTAACGCTGAATACAATTCCC-3' y TBP3': 5'-AGGAAACAACCTCGGGTTCATA-3'). El programa usado para la síntesis de DNAc fue: 45°C por 30 min, y para la amplificación por PCR fueron 30 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 30 seg, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 15 min. El fragmento obtenido fue purificado, clonado en el vector pCRII (Invitrogen) y secuenciado en un secuenciador automático ABI Prism 373 (Applied Biosystems, Grand Island, NY). La sonda obtenida fue usada para aislar la clona completa de TsTBP1 mediante el tamizaje de 45,000 fagos de una biblioteca de DNAc de *T. solium* construida en el fago filamentoso λZAP II, descrita previamente (Molina-López et al, 2006). Los insertos de las clonas positivas fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos que flanquean el linker del vector, clonadas en pCRII y secuenciadas, como

se describió arriba. Lo análisis bioinformáticos como la traducción de la secuencia nucleotídica y los alineamientos múltiples se llevaron a cabo usando los programas PC GENE y Clustal X.

### **Aislamiento del gen que codifica para TsTBP1.**

La preparación del DNA genómico (DNAg) de *T. solium* y el crecimiento en 100,000 clonas de una biblioteca de DNAg se llevó a cabo, como esta descrito anteriormente (Campos A., et al., 1990), usando una sonda completa del DNAC que codifica para TsTBP1. La clona obtenida (~1.5 kpb) fue amplificada, purificada y clonada en el vector pCRII (Invitrogen, Carlsbag, CA). Los plásmidos con el fragmento de 1.5 kb fueron secuenciados y analizados como ya se describió anteriormente.

### **Determinación del sitio de inicio de transcripción (TSS) mediante método de 5'-RACE.**

El RNA total de *T. solium* fue preparado con TRIzol (Invitrogen) y usado como templado para la determinación del TSS usando el kit 5'-RACE cDNA Amplification (Clontech, Mountain View, CA). Los fragmentos de 5'-RACE obtenidos fueron amplificados por PCR usando los oligonucleótidos reversos TBPRE (5'-TCTTATCTCAAGATTACTGTACACAC-3') y TBPRE2 (5'-CACAATGTTTTGTAGCTGTGGCTGAGG-3') y el primer SMARTII (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') contenido en el kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pCRII (Invitrogen), secuenciado y analizados como ya se mencionó anteriormente.

### **Análisis tipo Southern y northern .**

El Southern se llevó a cabo usando 10 µg de DNAg digerido por separado con las enzimas de restricción *Hind* III, *Bam*HI, *Eco*RI and *Bgl*II. El DNA digerido fue separado en un gel de agarosa al 1% y transferido a una membrana de nylon (Amersham, Pittsburgh,PA). Para el northern 10 µg de RNA total de larva fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con formaldehído y transferido a una membrana de nylon. La pre hibridación e hibridación se llevó a cabo de acuerdo a Sambrook et al (1989). Como sonda se usó la secuencia completa del DNAC que codifica para TsTBP1.

### **Modelado molecular.**

La estructura de la secuencia deducida para TsTBP1 y TsTAF6 fueron modeladas con el software MOE 2013.08, usando como templatado las estructuras TFIIA/TBP/DNA de humano (PDB ID: 1NVP) y TAF6 de *Antonosporea locustae* (PDB ID: 4ATG). Diez modelos fueron construidos como resultado de la selección permutacional de diferentes candidatos de cadenas laterales y rotámeros. El mejor modelo intermediario, fue seleccionado para optimizar la minimización de energía usando un gradiente del promedio de la desviación cuadrada mínima (RMSD) igual a 0.01. La calidad geométrica del modelo final fue verificado mediante un gráfico de Ramachandran. El programa APBS fue usado junto con PyMOL para visualizar el modelo construido.

### **Producción de anticuerpos.**

Dos péptidos fueron sintetizados, uno al inicio del NH<sub>2</sub>-ter (pTsTBP1-N, MQPTPINQLVSVVGSYAAPSSTQAHSRPPYTPNTPG), y otro al final del COOH-ter (pTsTBP1-C, VRDEIYQAFNNIYPILKNFMKLDSDKSGLHQPALTG). Anticuerpos policlonales fueron producidos en conejo mediante cuatro inmunizaciones subcutáneas cada dos semanas, usando 100 µg de cada péptido mezclado con saponina (10 µg). Los conejos fueron sangrados 7 días después de la última inmunización, y el suero obtenido fue congelado a -20°C. La fracción de inmunoglobulinas G (anticuerpos) fueron purificadas del suero de conejo mediante cromatografía de afinidad con proteína G-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### **Extracto nuclear de *Taenia solium*.**

Cisticercos de *T. solium* (10 g) fueron homogenizados en el amortiguador A (20 mM HEPES, 20 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% Glicerol, 0.5% Nonidet P-40, 0.2 mM EDTA, 1 µM Pepstatin, 0.6 µM Leupeptin, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) en un Ultra Turrax T8 (IKA, Wilmington, NC). La suspensión fue centrifugada a 10,000xg por 20 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 4 mL de amortiguador A y adicionado a un tubo que contiene 10 mL de solución de Ficoll (5.7%). Este tubo fue centrifugado a 3,300xg por 15 min. El precipitado resultante fue resuspendido en 1 mL del amortiguador B (20mM HEPES, 1.2 mM KCl, 1.5 mM –MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25% Glicerol, 1 µM Pepstatin, 0.6 µM Leupeptin,

0.2 mM PMF, 0.5 mM DTT) y agitado gentilmente por 45 min. La suspensión obtenida fue centrifugada a 14,000xg por 30 min, el sobrenadante fue cuantificado por el método de Bradford y almacenado a -70°C, hasta su uso. Todos los pasos del protocolo se hicieron a 4°C. La integridad del extracto nuclear (2.5 µg/mm de gel) fue determinado en un SDS-PAGE (10%) con 2-mercaptoetanol y teñido con Azul de Coomassie.

### **Identificación de TsTBP1 por western e inmunofluorescencia.**

Para el western, 5 µg de extracto nuclear por mm de gel fue transferido a una membrana de PVDF. Dichas membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-pTsTBP1-N, anti-TsTBP1-C, anti-TAF6 e IgG preimmune de conejo, todos a dilución 1:100; las membranas se lavaron con PBS-0.3% Tween y se incubaron con anticuerpos conjugados con peroxidasa anti-conejo. Las membranas fueron reveladas con la 3,3'-diamino bencidina y 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para la inmunofluorescencia, los cisticercos de *T. crassiceps* fueron incluidos en Tissue Tek, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C. Se realizaron cortes de aproximadamente 6 a 8 µm y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS. Las muestras se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0.01% (v/v) por 30 min y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% (w/v) en PBS por 30 min adicionales. Los cortes tratados se incubaron toda la noche con anticuerpos anti-pTsTBP1-N, anti-histona H1, e IgGs preinmunes de ratón como control negativo (todos los anticuerpos fueron diluidos 1:100). Los cortes fueron lavados tres veces con PBS e incubados a temperatura ambiente por 30 min. con anticuerpos anti-ratón conjugados con Alexa-568 y con anticuerpos anti-conejo conjugados con Alexa-488 (diluidos 1:200 en PBS-3% BSA). Los cortes fueron lavados tres veces con PBS e incubados 5 min a temperatura ambiente con 4,6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). Los cortes se lavaron como antes y se montaron con glicerol-PBS (9:1). Se obtuvieron imágenes de plano simple con el microscopio confocal LSM-META-Zeiss Axioplan 2. La co-localización de las imágenes se realizó con el software ZEN 2010 versión 6.0 (Carl Zeiss).

### **Ensayos de retardo de la movilidad Electroforética (EMSA).**

Para generar sondas de DNA de doble cadena para los ensayos, los oligonucleótidos diseñados sobre el promotor fueron mezclados en una relación 1:1, calentados a 95°C por 5

min y enfriados gradualmente hasta temperatura ambiente. Dichas sondas fueron marcadas con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Perkin Elmer, Boston, MA) usando la T4 polinucleótido cinasa. Las reacciones de unión se llevaron a cabo preincubando a temperatura ambiente 17.5 fmol de cada sonda, 1  $\mu$ g de poli(dI-dC) y 10  $\mu$ g de extracto nuclear en el amortiguador de unión (20% glicerol; 2.5 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 2.5 mM DTT). Para los ensayos de competencia, un exceso molar de 25, 50 y 100 veces de la sonda no marcada fue adicionada a la reacción de unión. Las reacciones fueron incubadas 30 min a temperatura ambiente. Para los ensayos de súper retardo, 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-pTsTBP1-N fue adicionado a la reacción e incubado por 30 min. Todas las reacciones fueron terminadas con el amortiguador de cargado (15% Ficoll, 0.25% Azul de Bromofenol, 0.25% Xilen Cianol en TBE). El complejo formado fue separado en un gel no desnaturalizante de poli(acrilamida al 5% y visualizado por auto radiografía del gel previamente secado (Reyes-Juarez et al, 2007). Para los análisis densitométricos, las autoradiografías fueron digitalizadas usando un scanner y analizados con el programa ImageJ (Schneider CA et al, 2012). La significancia estadística fue definida por la prueba de t de Student a dos colas con  $P < 0.005$ , y los resultados se presentan como porcentaje  $\pm$  DS de la banda retardada.

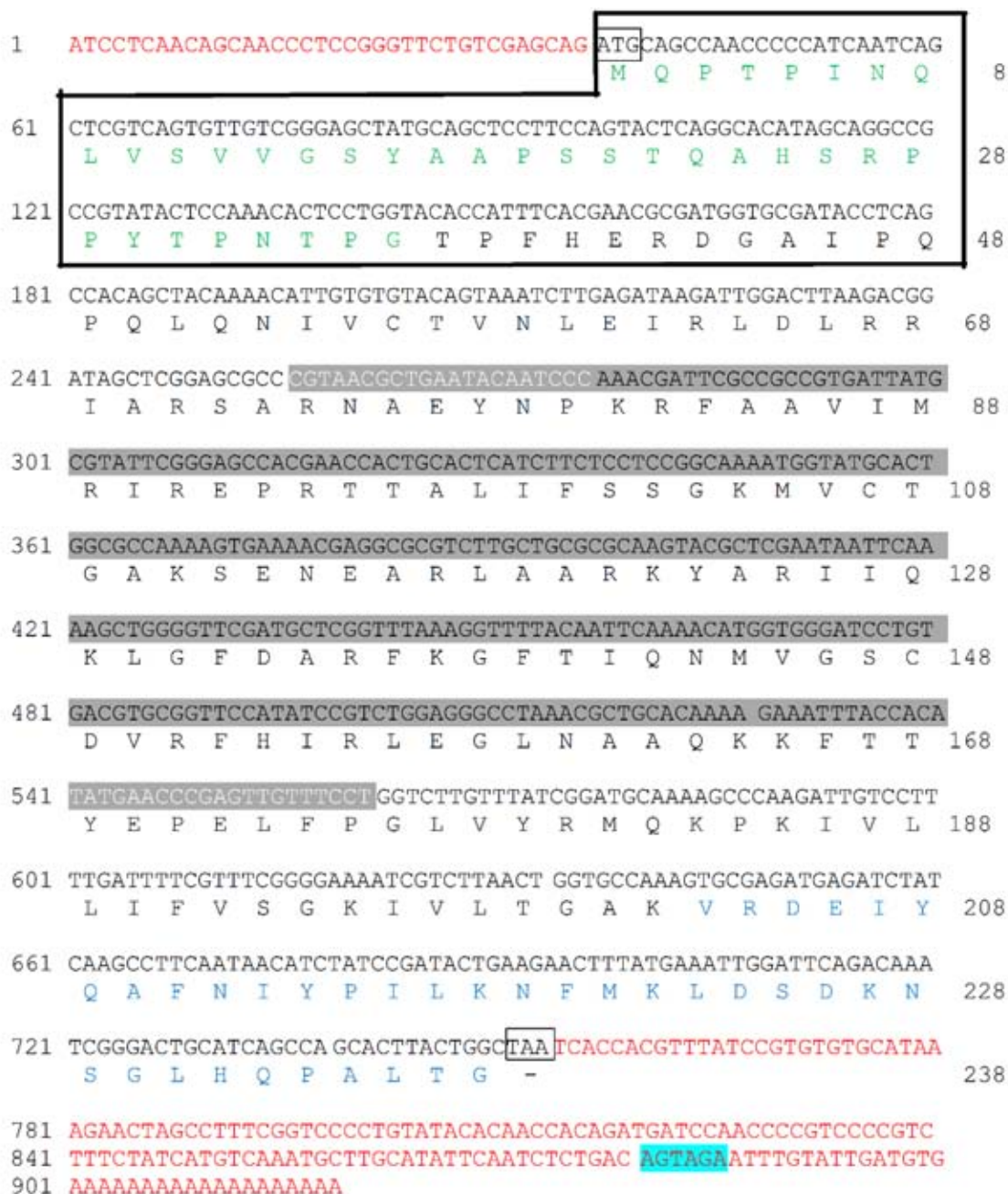
Para determinar si el anticuerpo anti-pTsTBP1-C era capaz de inhibir la unión de TsTBP1 a la caja TATA del promotor del gen de pAT5, se llevó a cabo un EMSA, pero usando una sonda de DNA marcada con biotina. La sonda se marcó con el kit Biotin Labeling (Pierce, Grand Island, NY). Brevemente, para los ensayos de súper retardo, 17.5 fmol de la sonda de pAT5 marcada fue incubada a temperatura ambiente con 1  $\mu$ g de poli(dI-dC) y 10  $\mu$ g de extracto nuclear de *T. solium* en amortiguador de unión por 30 min, posteriormente 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-pTsTBP1-C fue agregado a la reacción e incubado por 30 min más. Para inhibir la unión, 10  $\mu$ g de extracto nuclear de *T. solium* se incubó con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-pTsTBP1-C y 1  $\mu$ g de poli(dI-dC) en amortiguador de unión, posteriormente se agrega 17.5 fmol de la sonda de pAT5 marcada, y la reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Adicionalmente, IgGs preinmunes de conejo y anticuerpos anti-pTsTBP1-N fueron usados en lugar de los anticuerpos anti-pTsTBP1-C en reacciones independientes como controles de súper retardo e inhibición. El mismo protocolo fue utilizado para la determinación de la interacción de TsTAF6 con los sitios putativos DPE de los promotores proximales de los genes de TsTBP1 y pAT5.

## Resultados.

### Análisis de la secuencia del DNAC de TsTBP1.

Una sonda homóloga a TsTBP1 de 306 pb fue producida mediante RT-PCR usando RNA total de cisticerco de *T. solium* y dos oligonucleótidos degenerados diseñados en dos motivos bien conservados de TBP. Esta sonda de DNAC nos permitió aislar dos clones de fagos idénticas de una biblioteca de DNAC de *T. solium*, la cual contenía la secuencia codificante completa de TsTBP1. La secuencia contiene 919 pb, con un marco abierto de lectura de la base 37 a la base 751, donde el codón de inicio de la traducción ATG corresponde a una Metionina y el codón de termino corresponde a TAA. La clona posee una región 5' no transcrita (5'-UTR) de 36 pb y un 3'-UTR de 168 pb, contiene una señal de poli adenilacion putativa en 880 pb (AGTAGA) (Beaudoing et al, 2000) y una cola de 18 adenosinas (ver Fig. 8). El marco abierto de lectura obtenido, codifica para un polipéptido de 238 aa, con un peso molecular predicho de 26.7 kDa y un pI teórico de 10.6. La secuencia de DNAC de TsTBP1 y su secuencia deducida está depositada en GenBank con el número de acceso KR673321.

Un alineamiento múltiple de secuencias primaria (Fig. 9) de varias TBP1 muestra que esta tiene una alta identidad con la TBP1 de *Echinococcus multilocularis* (97%, EmTBP1) y con la de *Echinococcus granulosus* (96%, EgTBP1); y menor identidad fue observada con TBP1 de *Homo sapiens* (64%, HsTBP1) y *Sus scrofa* (62%, SsTBP1). El NH<sub>2</sub>-ter es aproximadamente dos tercios más corto y conservado entre EgTBP1, EmTBP1 y TsTBP1 (92%) y menos conservado en TBP1 de cerdo y humano (31% en ambos casos). Además, su COOH-ter presenta todos los residuos importantes involucrados en el reconocimiento del DNA (N<sup>53</sup>, R<sup>82</sup>, F<sup>83</sup>, R<sup>89</sup>, F<sup>100</sup>, K<sup>104</sup>, K<sup>111</sup>, N<sup>143</sup>, F<sup>174</sup>, R<sup>180</sup>, F<sup>191</sup>, K<sup>195</sup>, K<sup>202</sup>) y de unión a los TFs como TFIIA (A<sup>70</sup>, A<sup>73</sup>, R<sup>74</sup>, N<sup>75</sup>, A<sup>76</sup>, E<sup>77</sup>, Y<sup>78</sup>, N<sup>79</sup>, K<sup>81</sup>, R<sup>89</sup>, I<sup>90</sup>, R<sup>91</sup>), TFIIB (E<sup>157</sup>, Y<sup>169</sup>, E<sup>170</sup>, P<sup>171</sup>, E<sup>172</sup>, L<sup>173</sup>, R<sup>180</sup>, V<sup>192</sup>, K<sup>223</sup>), NC2 (P<sup>80</sup>, R<sup>82</sup>, F<sup>166</sup>, Y<sup>179</sup>, R<sup>180</sup>, M<sup>181</sup>, K<sup>183</sup>, K<sup>185</sup>, N<sup>213</sup>, I<sup>214</sup>, P<sup>216</sup>, I<sup>217</sup>, K<sup>219</sup>), y TAF1 (A<sup>70</sup>, R<sup>74</sup>, N<sup>75</sup>, E<sup>77</sup>, Y<sup>78</sup>, A<sup>84</sup>, R<sup>91</sup>, S<sup>101</sup>, S<sup>102</sup>, R<sup>117</sup>, R<sup>121</sup>, K<sup>122</sup>, R<sup>125</sup>, K<sup>129</sup>) (Kim et al, 1993; Patikoglou et al, 1999; Tan et al, 1996; Burley SK, 1996; Littlefield et al, 1999; Kamada et al, 1999; Cang and Prelich, 2002; Gilfillan, 2005; Anandapadamanaban et al, 2013). Asimismo, una característica remarcable es que la TBP1 posee 13 residuos adicionales en taeniidos que no están presentes en las TBP1 de cerdo y humano.



**Figura 8.** Secuencia nucleotídica del ADNc que codifica para una TBP1 de *Taenia solium* (TsTBP1, número de acceso a GenBank: KR673321). Números a la izquierda corresponden a los nucleótidos y a la derecha a los aminoácidos. La región NH<sub>2</sub>-ter está señalada en un cuadro. Los codones de inicio y paro están marcados con cuadros pequeños. Los nucleótidos resaltados en gris corresponden a la sonda utilizada para aislar la secuencia nucleotídica completa que codifica para la TsTBP1. Los aminoácidos en verde y azul corresponden a los péptidos sintéticos usados para generar anticuerpos. El sitio putativo de poliadenilación está resaltado en cian, los 5' y 3'-UTR están marcados en rojo.

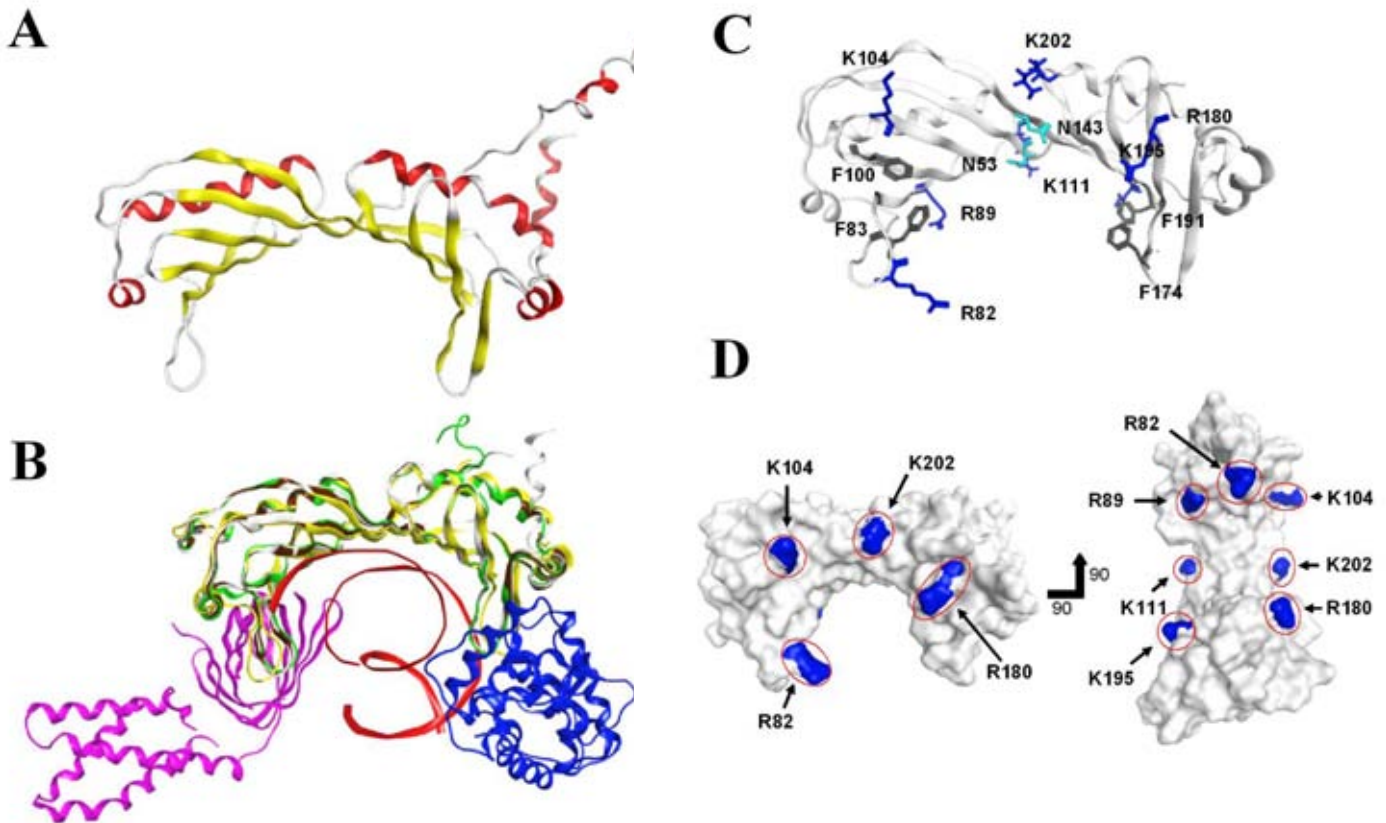
|        |                                                                                                                                                                                     |           |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| SsTBP1 | MDQNNSLPPYAQGLASPQ-----KHSVVMYHS---LSVIQMFSALSCLGTRRHVEC                                                                                                                            | 50        |
| HsTBP1 | MDQNNSLPPYAQGLASPQGAMTPGIPIFSPMPYGTGLTPQPIQNTNSLSILEEQQRQQQQ                                                                                                                        | 61        |
| EgTBP1 | -----                                                                                                                                                                               | 0         |
| EmTBP1 | -----                                                                                                                                                                               | 0         |
| TsTBP1 | -----                                                                                                                                                                               | 0         |
| SsTBP  | VRWLRLGPMPYGTGLTPQPIQNTNSLSILEEQXXXXXXXXX-----TPQLF                                                                                                                                 | 97        |
| HsTBP1 | QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAVAAAQQSTSQATQGTSGQAPQLF                                                                                                                               | 122       |
| EgTBP1 | -----MQPTPVN-----QLV                                                                                                                                                                | 10        |
| EmTBP1 | -----MQPTPVN-----QLV                                                                                                                                                                | 10        |
| TsTBP1 | -----MQPTPIN-----QLV                                                                                                                                                                | 10        |
|        | :                                                                                                                                                                                   | .         |
| SsTBP1 | HSQTLTTAPLPGTTPLYPSPMTPMTPIITPKLKMAVLALNRFFYLIEVVPICNRIVGNIVST                                                                                                                      | 158       |
| HsTBP1 | HSQTLTTAPLPGTTPLYPSPMTPMTPIITPATPASESS-----GIVPQ-----LQINIVST                                                                                                                       | 171       |
| EgTBP1 | SVVGSYAAPSSAQHSRP-PCTPNTPGTFFHERD-----GVIPOQ-----LQINIVCT                                                                                                                           | 57        |
| EmTBP1 | SVVGSYAAPSSAQHSRP-PCTPNTPGTFFHERD-----GVIPOQ-----LQINIVCT                                                                                                                           | 57        |
| TsTBP1 | SVVGSYAAPSSTQHSRP-PYTPNTPGTFFHERD-----GAIPQ-----LQINIVCT                                                                                                                            | 57        |
|        | : . :                                                                                                                                                                               | : .       |
| SsTBP1 | VNLGCKLDLKTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIEPRTTALI FSSGKMVCTGAKSEEQS                                                                                                                         | 219       |
| HsTBP1 | VNLGCKLDLKTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIEPRTTALI FSSGKMVCTGAKSEEQS                                                                                                                         | 232       |
| EgTBP1 | VNLEIRLDLRRIAQSARNAEYNPKRFAAVIMRIEPRTTALI FSSGKMVCTGAKSENEAR                                                                                                                        | 118       |
| EmTBP1 | VNLEIRLDLRRIAQSARNAEYNPKRFAAVIMRIEPRTTALI FSSGKMVCTGAKSENEAR                                                                                                                        | 118       |
| TsTBP1 | VNLEIRLDLRRIRARSARNAEYNPKRFAAVIMRIEPRTTALI FSSGKMVCTGAKSENEAR                                                                                                                       | 118       |
|        | : :                                                                                                                                                                                 | :::       |
| SsTBP1 | AA <sup>SK</sup> YARVVQ <sup>KL</sup> GLGFP <sup>AK</sup> FLDFEKIQNMVGS <sup>CD</sup> VKFPIRL <sup>EG</sup> LVLT <sup>HQ</sup> Q <sup>ES</sup> SYEPELFPGLI <sup>Y</sup>             | 280       |
| HsTBP1 | AA <sup>SK</sup> YARVVQ <sup>KL</sup> GLGFP <sup>AK</sup> FLDFEKIQNMVGS <sup>CD</sup> VKFPIRL <sup>EG</sup> LVLT <sup>HQ</sup> Q <sup>ES</sup> SYEPELFPGLI <sup>Y</sup>             | 293       |
| EgTBP1 | AA <sup>SK</sup> YAR <sup>II</sup> Q <sup>KL</sup> GLGFDAR <sup>FK</sup> GFTIQNMVGS <sup>CD</sup> VR <sup>FH</sup> IRL <sup>EG</sup> LNAAQ <sup>KK</sup> FTTYEPELFPGLV <sup>Y</sup> | 179       |
| EmTBP1 | AA <sup>SK</sup> YAR <sup>II</sup> Q <sup>KL</sup> GLGFDAR <sup>FK</sup> GFTIQNMVGS <sup>CD</sup> VR <sup>FH</sup> IRL <sup>EG</sup> LNAAQ <sup>KK</sup> FTTYEPELFPGLV <sup>Y</sup> | 179       |
| TsTBP1 | AA <sup>SK</sup> YAR <sup>II</sup> Q <sup>KL</sup> GLGFDAR <sup>FK</sup> GFTIQNMVGS <sup>CD</sup> VR <sup>FH</sup> IRL <sup>EG</sup> LNAAQ <sup>KK</sup> FTTYEPELFPGLV <sup>Y</sup> | 179       |
|        | :: : . . :                                                                                                                                                                          | : : : : : |
| SsTBP1 | RM <sup>I</sup> KPRIVLLI <sup>FV</sup> SGKVVLTGAKVRAE <sup>II</sup> YEA <sup>FE</sup> NIY <sup>PIL</sup> KGFR <sup>KT</sup> T-----                                                  | 326       |
| HsTBP1 | RM <sup>I</sup> KPRIVLLI <sup>FV</sup> SGKVVLTGAKVRAE <sup>II</sup> YEA <sup>FE</sup> NIY <sup>PIL</sup> KGFR <sup>KT</sup> T-----                                                  | 339       |
| EgTBP1 | RM <sup>Q</sup> KPKIVLLI <sup>FV</sup> SGKIVLTGAKV <sup>RD</sup> E <sup>II</sup> YQAF <sup>NI</sup> Y <sup>PIL</sup> KNFM <sup>KL</sup> DS <sup>DK</sup> SGLH <sup>QQA</sup> ISG    | 238       |
| EmTBP1 | RM <sup>Q</sup> KPKIVLLI <sup>FV</sup> SGKIVLTGAKV <sup>RD</sup> E <sup>II</sup> YQAF <sup>NI</sup> Y <sup>PIL</sup> KNFM <sup>KL</sup> DS <sup>DK</sup> SGLH <sup>QQA</sup> ISG    | 238       |
| TsTBP1 | RM <sup>Q</sup> KPKIVLLI <sup>FV</sup> SGKIVLTGAKV <sup>RD</sup> E <sup>II</sup> YQAF <sup>NI</sup> Y <sup>PIL</sup> KNFM <sup>KL</sup> DS <sup>DK</sup> SGLH <sup>QPA</sup> LTG    | 238       |
|        | : :                                                                                                                                                                                 | : . .     |

**Figura 9. Alineamiento múltiple de proteínas de unión a caja TATA 1 (TBP1).** TsTBP1 fue alineada con las TBP1 de *Sus scrofa* (SsTBP1, GeneBank ID: XP\_003361466.1), de *Homo sapiens* (HsTBP1, GeneBank ID: NP\_003185.1), de *E. granulosus* (EgTBP1, GeneBank ID: CDS17003.1), y de *E. multilocularis* (EmTBP1, GeneBank ID: CDJ04746.1). La región NH<sub>2</sub>-ter está encerrada en un cuadro, los aminoácidos restantes forman la región COOH-ter. Aminoácidos idénticos están resaltados en fondo gris, los residuos que unen al ADN están en rojo, al TFIIA en blanco, al TFIIB en azul; al NC2 en naranja y al TAF1 en amarillo. Los símbolos significan: (-) ausencia y (:) homología de aminoácidos.

### Estructura proteica de la TsTBP1.

La Fig. 10A muestra un modelo de la estructura de la TsTBP1 construido por homología de acuerdo con la secuencia deducida de aminoácidos y la estructura de rayos X del complejo humano TFIIA/TBP/DNA como templado (PDB ID: 1NVP). Para evaluar la calidad del modelo resultante, se construyó un gráfico de Ramachandran, y su inspección mostró que no había aminoácidos en las regiones no permitidas. La estructura obtenida para la región COOH-ter consiste en dos subdominios idénticos que adoptan una estructura  $\alpha/\beta$  quasi-simétrica, asemejando una silla de montar. El dominio cóncavo, es altamente curvada y está constituida por 10 hebras  $\beta$  anti paralelas, y la parte convexa consiste en cinco hélices  $\alpha$ , ambas regiones contienen aminoácidos conservados importantes para el reconocimiento de DNA y TF's, como se mencionó previamente. Adicionalmente, la región NH<sub>2</sub>-ter está conformado por tres pequeñas hélices  $\alpha$ . Esta región es altamente divergente en tamaño y secuencia entre especies (Hernandez N, 1993), además por su alta movilidad, es difícil determinar su estructura mediante la difracción de rayos-X (Nikolov et al, 1992; Chasman et al, 1993). En la Fig. 10B se muestra la superposición de la región COOH-ter del modelo de TsTBP1 con las estructuras tridimensionales de las TBP1 de levadura (PDB ID: 1TBP), del complejo humano de TFIIB/TBP/DNA (PDB ID: 1VOL) y del complejo humano de TFIIA/TBP/DNA (PDB ID: 1NVP), se observa un alto grado de similitud estructural en dichas proteínas. El valor obtenido de RMSD (solo considerando C $\alpha$ ) fue de 1.32, 1.04 y 0.52 Å, respectivamente. La Fig. 10B también muestra los dominios de interacción de TsTBP1 (blanco), HsTBP1 (verde y café) y *Saccharomyces cerevisiae* TBP1 (amarillo, ScTBP1) con TFIIA (rosa), TFIIB (azul) y DNA (rojo). Nótese que estos dominios de interacción están estructuralmente conservados y encajan con los datos cristalográficos para los TFs y DNA. Existe una hélice  $\alpha$  extra al final de la región COOH-ter de la TsTBP1, la cual está ausente en HsTBP1 y ScTBP1. La Fig. 10C muestra la localización de los residuos importantes en la interacción con DNA: una serie de Lisinas (azul oscuro) que interaccionan con los grupos fosfatos del ADN; cuatro Fenilalaninas (negro) que se intercalan en el surco menor del ADN permitiendo su apertura. Asimismo, dos Asparaginas (cyan) simétricas que forman puentes de hidrógeno en el centro. La fig. 10D muestra los parches positivos localizados sobre los aminoácidos conservados involucrados en el reconocimiento de DNA (R<sup>82</sup>, R<sup>89</sup>, K<sup>104</sup>, K<sup>111</sup>, R<sup>180</sup>, K<sup>195</sup>, K<sup>202</sup>) y revela la superficie accesible al solvente. Dichos residuos generan una

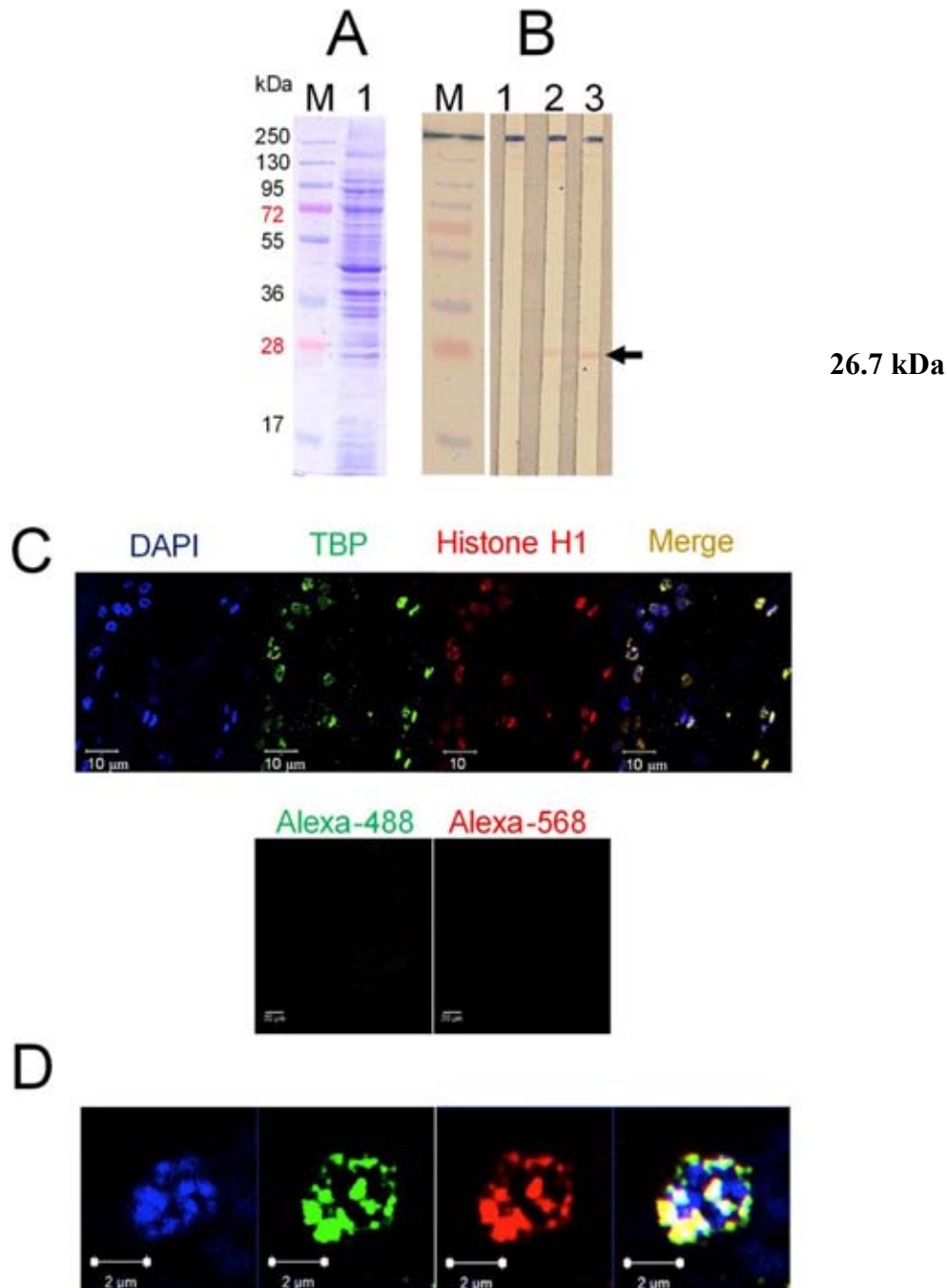
densidad de carga positiva en la parte cóncava de la isosuperficie de TsTBP1, y permite una fuerte interacción con los grupos fosfatos del ADN.



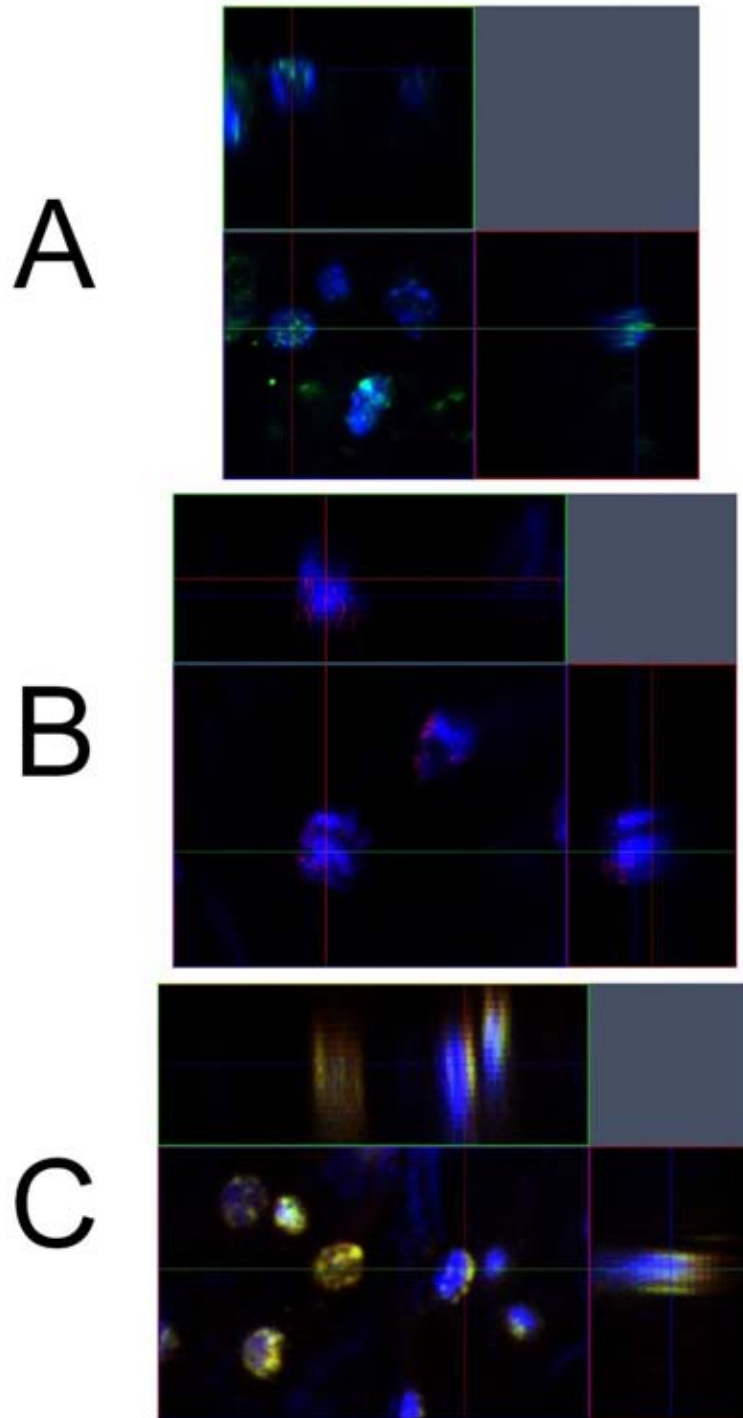
**Figura 10. Análisis estructural de la TsTBP1.** A) Representación de la estructura 3D obtenida por modelado por homología de la TsTBP1 a partir de la secuencia de aminoácidos deducida (lamina  $\beta$  se observan en amarillo y hélices  $\alpha$  en rojo). B) Superposición de la región COOH-ter del modelo de la TsTBP1 (en blanco) con las estructuras de rayo-X de la TBP1 de *S. cerevisiae* (en amarillo, PDB ID 1RM1), del complejo de humano TFIIB/TBP/DNA (en azul, verde y rojo, PDB ID: 1VOL) y del complejo de humano TFIIA/TBP1 (en rosa y café, PDB ID 1NVP). C) Localización de los aa involucrados en el reconocimiento al ADN (azul oscuro) y grupos fosfato (gris y cyan). D) Superficie accesible al solvente en la región COOH-ter mostrado de frente y por debajo. Los parches azules muestran la densidad positiva involucrada en la unión al ADN.

### **Identificación y localización de TBP1 en el tejido del cisticerco.**

Mediante SDS-PAGE se observó la integridad del extracto nuclear de *T. solium*, mostrando proteínas en un rango de 10 a 250 kDa (Fig. 11A, carril 1). El análisis mediante western blot mostró que los anticuerpos anti-pTsTBP1-C y anti-pTsTBP1-N reconocen una banda de ~26 kDa (TsTBP1 nativa) en extracto nuclear de cisticerco, (Fig. 11B, carriles 2 y 3, respectivamente). En contraste, cuando se usan IgGs preinmunes de conejo, no se reconocen bandas (Fig. 11B, carril 1). Mediante el uso de microscopia confocal, usando DAPI, anticuerpos anti-pTsTBP1-C y anti-histona H1, se observó la presencia de DNA, TBP1 e histona H1 en los núcleos de las células de la pared vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*, no se observó señal cuando se usaron IgGs preinmunes de ratón o conejo y anticuerpos secundarios como control (Fig. 11C). Asimismo, se muestra una amplificación digital y el solapamiento de las señales (Fig. 11D) mostrando una co-localización del DNA, la TBP1 y la histona H1 (señal amarilla). El análisis de la fluorescencia en los planos xyz mostraron que la TBP1 y la histona H1 están dentro del núcleo (Fig. 12), asimismo la cuantificación de la fluorescencia muestra una relación 100:79 para la histona H1 y la TBP1 respectivamente (Fig. 13), no se observó diferencia estadística significativa entre estas dos.

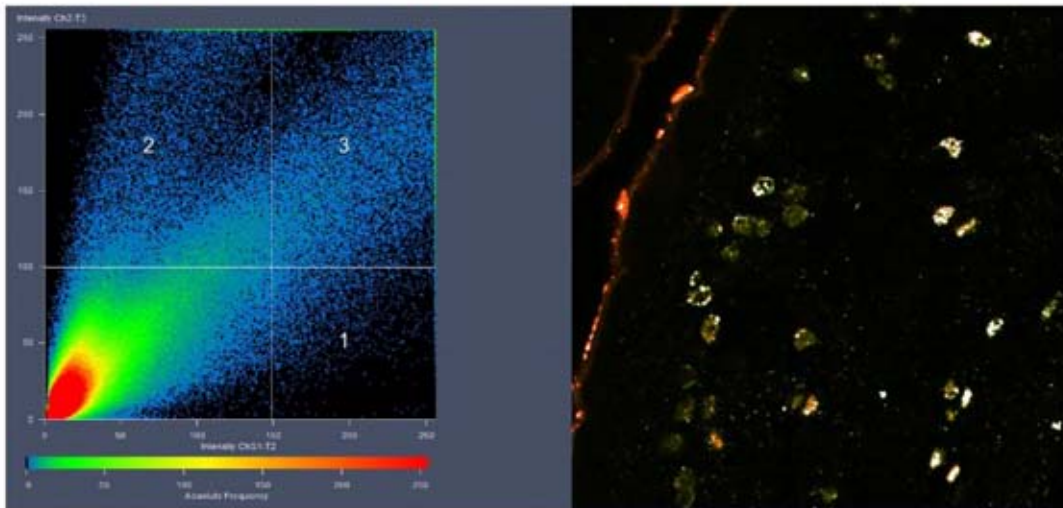


**Figura 11. Composición del extracto nuclear e inmunodetección de la TsTBP1.** A) SDS-PAGE al 10% mostrando el patrón de proteínas del extracto nuclear de *T. solium* teñido con azul de Coomassie (carril 1). B) Western donde se localiza la TsTBP1 en el extracto nuclear con: IgG preinmune (carril 1), anticuerpos anti-pTsTBP1-N (carril 2), y anticuerpos anti-pTsTBP1-C (carril 3). C) Localización de la TsTBP1 en cisticercos de *Taenia crassiceps* mediante microscopia confocal usando DAPI (azul), anti-histona H1 (verde), anti-pTsTBP1-N (rojo) y el sobrelape de las imágenes (amarillo). Control negativo para el anticuerpo primario y secundario. D) Amplificación digital de un núcleo aislado, mostrando la tinción con DAPI (azul), los anticuerpos anti-histona H1 (verde), anti-pTsTBP1-N (rojo). Al final se muestra el sobrelape de las tres imágenes (amarillo).

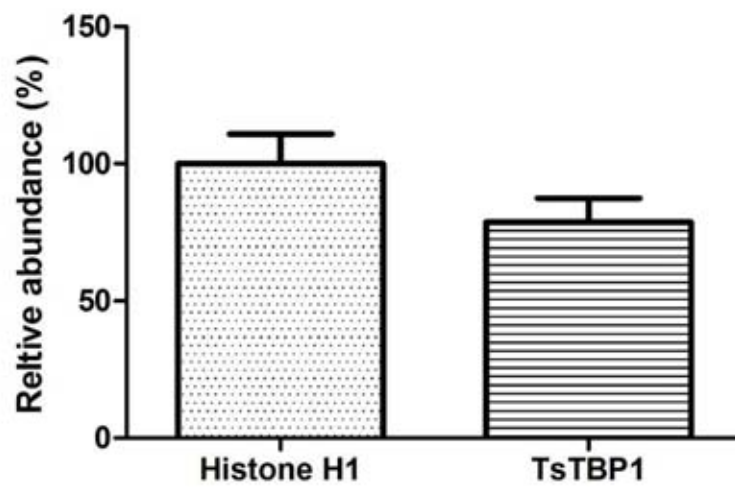


**Figura 12. Planos xyz de la microscopía confocal del experimento de la Fig.11, donde se muestra la fluorescencia dentro del núcleo. A) DAPI + TsTBP1, B) DAPI + Histona H1, y C) DAPI + TsTBP1 + Histona H1.**

A



B



**Figura 13. Cuantificación de la fluorescencia obtenida en la microscopía confocal del experimento de la Fig.11. A) Representación esquemática de la cuantificación de fluorescencia y el plano usado para el análisis. B) Abundancia relativa de la Histona H1 (100%) y la TsTBP1 (79%), no se observó significancia estadística.**

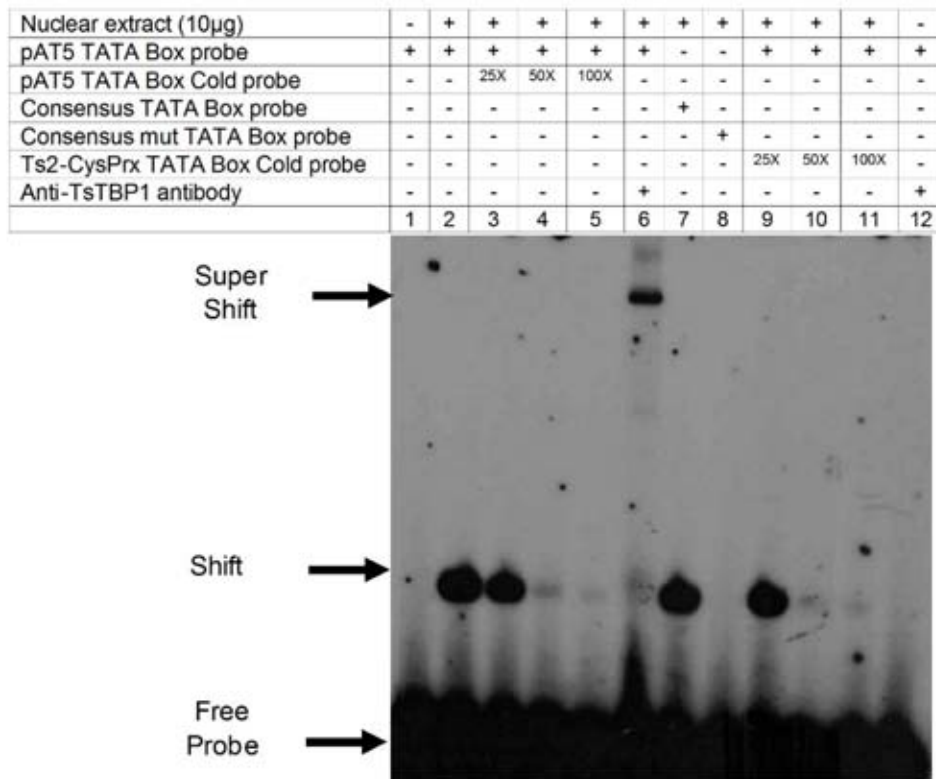
### **Interacción de la TsTBP1 con el motivo caja TATA.**

Para establecer la interacción de TsTBP1 con el motivo TATA, se realizó un EMSA. Como sonda usamos dos cajas TATA putativas localizadas en los promotores proximales de los genes de *T. solium*: de Actina 5 (pAT5) y de la 2-Cys peroxirredoxina (Ts2-CysPrx), ambos localizados entre -30 a -23 pb relativos al sitio de inicio de la transcripción. Asimismo, usamos como control la caja TATA del promotor tardío de Adenovirus Major (Tabla 1). La interacción de la TsTBP1 con las cajas putativas de los genes pAT5 (Fig. 14) y Ts2-CysPrx (Fig. 15) muestran una banda de retardo debido a la unión de la TsTBP1 a su respectiva sonda (ver carril 2, Figs. 14A y 15A). En los carriles 3, 4 y 5 de la Fig. 14A, se observa una disminución en la intensidad de la banda debido a la competencia homóloga con la caja TATA del gen de pAT5 no marcada. El análisis densitométrico muestra una disminución del 17%, 72% y 89% para los carriles 3, 4 y 5 de la Fig. 15A, también se puede ver una disminución en la intensidad de la banda de retardo con la caja TATA de Ts2-CysPrx. El análisis densitométrico mostró que el decremento en la banda es de 61%, 73% y 87% cuando hay un 25X, 50X y 100X de exceso molar de sonda no marcada, respectivamente (Fig. 15B). En el carril 6 de las Figs. 14A y 15A se observa una banda de súper retardo debida a la interacción con el anticuerpo anti-pTsTBP1-N. En el carril 7 de ambas figuras, una banda de retardo es observada cuando se usa la caja TATA consenso de Adenovirus Major. En contraste, en los carriles 8, se observa la ausencia de banda de retardo cuando se hace interaccionar con la caja TATA consenso de Adenovirus Major mutada. La Figura 7A en los carriles 9, 10 y 11, muestra la competencia heteróloga de la caja TATA del gen pAT5 (marcada) con Ts2-CysPrx (no marcada) con un exceso molar de 25X, 50X y 100X, respectivamente. Una fuerte competencia se observa usando un exceso molar de 50X, donde la densidad de la banda de retardo disminuye hasta 36% (Fig. 14B). En contraste, en la Figura 15A, carriles 9, 10 y 11, se muestra la competencia heteróloga de la caja TATA del gen Ts2-CysPrx (marcada) con la del gen pAT5 (no marcada), una fuerte competencia se observa desde 25X de exceso molar de sonda no marcada, donde la densidad de la banda disminuye hasta un 24% (Fig. 15B). Finalmente, en los carriles 12 de las figuras 14A y 15A, no se observa banda de retardo, sólo cuando se usa el anticuerpo anti-pTsTBP1-N y no se adiciona extracto nuclear.

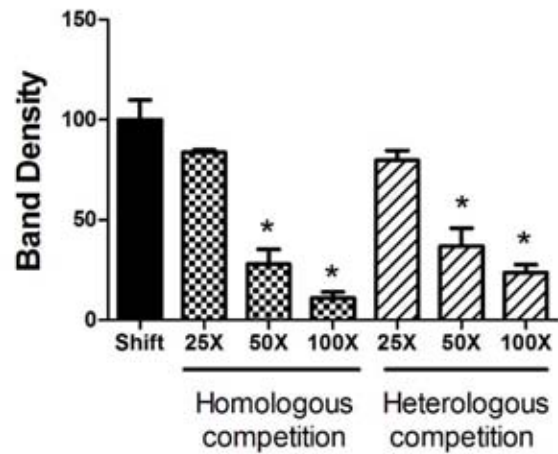
**Tabla 1.** Sondas de doble cadena usadas para demostrar la interacción entre la TsTBP1 y las cajas TATA y DPE por EMSA. Las letras en negritas representan las secuencias correspondientes a la caja TATA y DPE; adicionalmente, las bases subrayadas corresponden a los nucleótidos que fueron mutados en dichas cajas.

|                             |                                                                                                  |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pAT5 TATA-box               | 5' - CCCAAATCT <b>TATATAA</b> CCGTGGGT - 3'<br>3' - GGGTTTAGAATATATTTGGCACCCA - 5'               |
| Ts2-CysPRX TATA-box         | 5' - GCGCTTCGC <b>TATATTTG</b> CGGGTAAG - 3'<br>3' - CGCGAAGCGATATAAACCGCCATTC - 5'              |
| Consenso TATA-box           | 5' - AAGGGGGGC <b>TATAAAG</b> GGGGTGGG - 3'<br>3' - TTCCCCCGATATTTTCCCCCAGCC - 5'                |
| Consenso TATA-box mutada    | 5' - AAGGGGGGC <b><u>TGT</u><u>GAAAG</u></b> GGGGTGGG - 3'<br>3' - TTCCCCCGATATTTTCCCCCAGCC - 5' |
| Putativa TsTBP1 TATA-box-97 | 5' - ATGTCAAC <b>ATTAAAATT</b> CTTCCTTG - 3'<br>3' - TACAGTTGTAATTTTAAGAAGGAAC - 5'              |
| Putativa TsTBP1 TATA-box-69 | 5' - TTTGCCTC <b>ATTTAAAAT</b> CCATTTGA - 3'<br>3' - AAACGGAGTAAATTTTAGGTAAACT - 5'              |
| Putativo pAT5 DPE           | 5' - ATCTGTATC <b>GGCTGT</b> CTGCAACATG - 3'<br>3' - TAGACATAGCCGACAGACGTTGTAC - 5'              |
| Putativo TsTBP1 DPE         | 5' - TCCGGGTTC <b>TGTCGAG</b> CAGATGCAG - 3'<br>3' - AGGCCCAAGACAGCTCGTCTACGTC - 5'              |

A

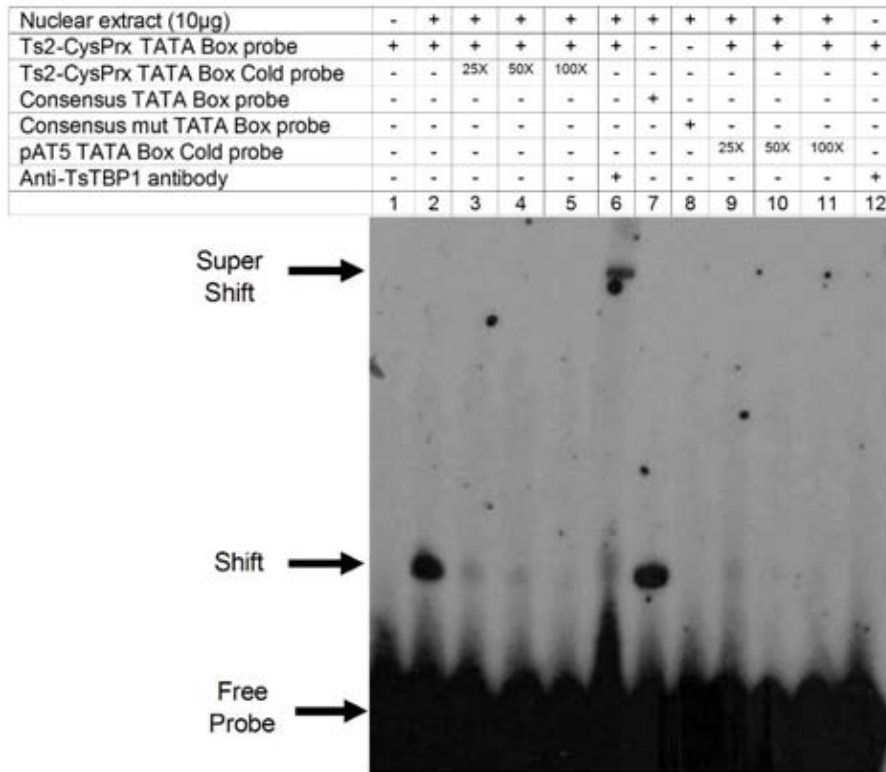


B

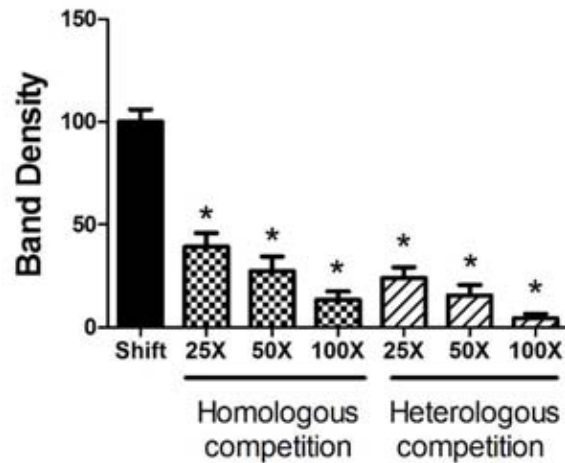


**Figura 14. EMSA mostrando la interacción de la TsTBP1 con la caja TATA del gen de pAT5.** A) Las bandas de retardo y súper retardo están señaladas con flechas, así como la sonda libre. En la tabla se observan los componentes de cada reacción. B) Análisis densitométrico mostrando el decremento en las competencias homólogas y heterólogas. Los resultados se muestran como porcentaje promedio  $\pm$  DS de la banda en el carril 2 ( $P < 0.005$ ).

A



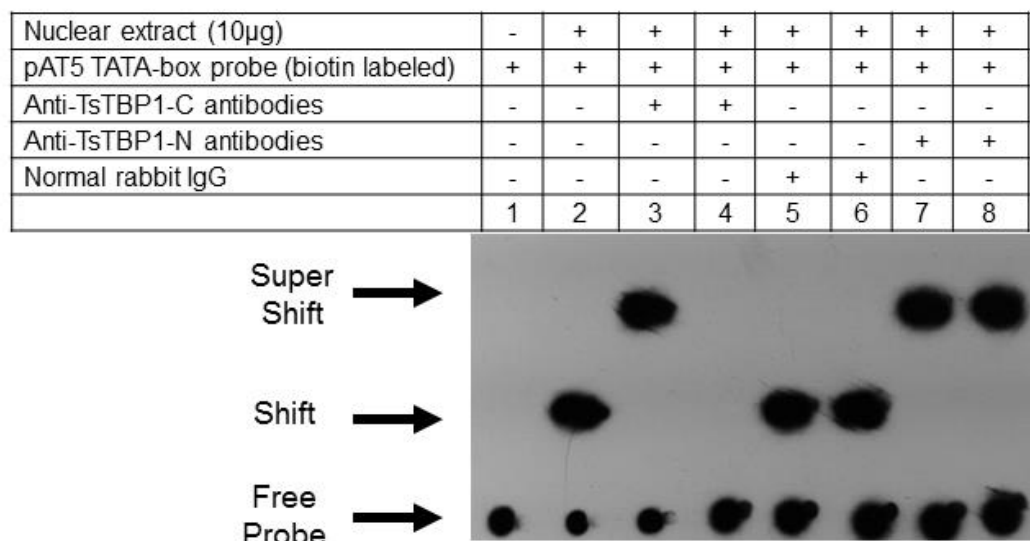
B



**Figura 15. EMSA mostrando la interacción de la TsTBP1 con la caja TATA del gen Ts2-CysPrx.** A) Las bandas de retardo, súper retardo y la sonda libre están señaladas con flechas. La tabla muestra los componentes de cada reacción. B) Análisis densitométrico mostrando el decremento en las competencias homólogas y heterólogas. Los resultados se muestran como porcentaje promedio  $\pm$  DS de la banda en el carril 2 ( $P < 0.005$ ).

### Inhibición de la unión de la TsTBP1 al motivo TATA.

Para ver si los anticuerpos son capaces de inhibir la unión de la TsTBP1 a la caja TATA del gen de pAT5, se realizó un EMSA. La Fig. 16 muestra que la incubación, primero del extracto nuclear de *T. solium* y la caja TATA del gen pAT5 (marcada con biotina), seguido de una incubación con anticuerpo anti-pTsTBP1-C, IgGs preinmunes de conejo y anticuerpos anti-pTsTBP1-N, producen una banda de súper retardo (carril 3), retardo (carril 5) y súper retardo (carril 7), respectivamente. En contraste, la incubación de extractos nucleares de *T. solium* con el anticuerpo anti-pTsTBP1-C, IgGs preinmunes de conejo y anticuerpos anti-pTsTBP1-N, seguido de la adición de la caja TATA de pAT5 (marcada con biotina), no producen ninguna banda en el carril 4, ni en el carril 6, pero si una banda de retardo en el carril 8, respectivamente. El carril 2 se muestra la banda de retardo control, y en el carril 1 se muestra el corrimiento libre de la sonda del gen para pAT5 en ausencia de extracto nuclear.



**Figura 16. EMSA mostrando la inhibición de la unión de la TsTBP1 a la caja TATA del gen de pAT5 usando el anticuerpo anti-pTsTBP1-C.** Carril 1: sonda marcada de pAT5 sin extractos nucleares. Carril 2: sonda marcada de pAT5 interaccionando con extractos nucleares. Carril 3: sonda marcada de pAT5 mas la adición de extracto nuclear y posteriormente anticuerpo anti-pTsTBP1-C. Carril 4: Extracto nuclear más la adición de anticuerpo anti-pTsTBP1-C, posteriormente se adiciona la sonda marcada de pAT5. Carril 5: sonda marcada de pAT5 adicionalmente extracto nuclear, posteriormente se agrega IgG de conejo preinmune. Carril 6: Extracto nuclear más la adición de IgG de conejo preinmune, posteriormente se adiciona sonda marcada de pAT5. Carril 7: sonda marcada de pAT5 mas la adición de extracto nuclear, posteriormente se adiciona anticuerpo anti-pTsTBP1-N. Carril 8: Extracto nuclear más anticuerpo anti-pTsTBP1-N, posteriormente se adiciona sonda marcada de pAT5.

### **Análisis genómico para el gen de la TsTBP1.**

Se aisló la secuencia genómica que codifica para la TsTBP1. Esta secuencia tiene una longitud de 1481 pb (Fig 17). La región codificante está dividida en cinco exones y cuatro intrones (Intrón I: 76 pb, desde +192 a +267; Intrón II: 208 pb, desde +512 a +719; Intrón III: 69 pb, desde +825 a +894; Intrón IV: 124 pb, desde +991 a +1114 pb relativos al sitio de inicio de transcripción) y presenta los sitios donador-aceptor (NGT-AGN) descrito por Chambon, donde se observa el sitio putativo de reconocimiento para U1 (Intrón I: GTAAGC; Intrón II: GTAAGA; Intrón III: GTTTCG; Intrón IV: ACAGGT, se muestra la secuencia donadora, subrayada), y una zona rica en pirimidinas como sitio de unión para el Factor Asociado a U2 (U2AF, Intrón I: TGTCTCTTTTACTTTCAG; Intrón II: TTTGCTTCCCTGCTTTAG; Intrón III: GGAGATTTTCTTCTTTAG; Intrón IV: AGACACTTTCCATACTTG, mostrando el sitio aceptor subrayado). Al igual que en la secuencia del DN<sub>Ac</sub>, la región codificante produce la misma proteína de 238 residuos y un peso teórico de 27.6 kDa.

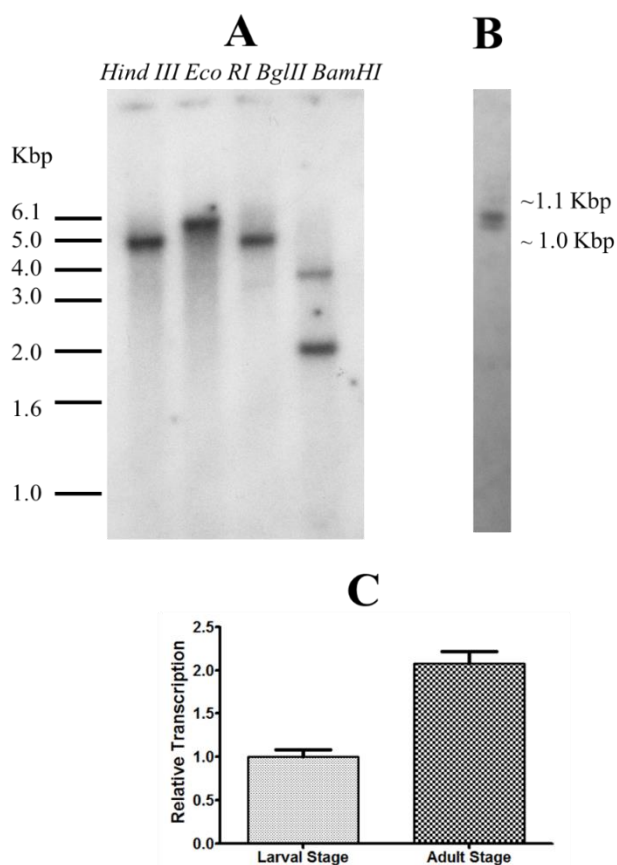
El sitio de inicio de transcripción (TSS), se determinó llevando a cabo una amplificación rápida de los extremos 5' de DN<sub>Ac</sub> (5'-RACE), encontrándose que corresponde a una Adenina que se encuentra dentro de la secuencia iniciadora (Inr, GCATCCT) y localizada a 36 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). Por otro lado, se encontraron sitios putativos de unión a factores de transcripción como NF1 a -192 pb, cajas CCAAT a -173 y -167 pb, YY1 a -119 pb, TBP a -97 y -69 pb, AP-1 a -57 pb, TAF1/TAF2 a -2 pb (Inr) y TAF6/TAF9 a +27 pb (DPE), todos relativos al TSS.

|      |                                                                                                                             |                                                   |                  |      |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|------|
|      | <b>NF1</b>                                                                                                                  | <b>CCAAT Box</b>                                  | <b>YY1</b>       |      |
| gDNA | AAAATGTTTTAATATCTGGTGTTCATTATTTCCAAACAGCATTAGCTTATTTCTATTTGCCATTACCATTGGCACTGGTATTCAAATATTGGACTTTTCTCTCGATTTTTCGCCTTCATACCC |                                                   |                  | -109 |
|      | <b>TBP</b>                                                                                                                  | <b>TBP</b>                                        | <b>Inr</b>       |      |
| gDNA | AACAAATGTCAACATTAAAAATCTTCTCTGTAATTGCGCTCATTTAAATCCATTGATTCCAACAGCCCTTCGTGGACCCCGCAACCAAGCAATGTAAGCATCGGCAGCATCTCAACA       |                                                   | <b>TAF1/TAF2</b> | 10   |
|      | <b>TAF6/TAF9</b>                                                                                                            |                                                   | +1 →             |      |
| gDNA | GCAACCTCCGGTTCTGTCTGAGCAGATG CAGCCAACCCCATCAATCAGCTCGTCAGTGTTGTCGGGAGCTATGCAGCTCCTTCCAGTACTCAGGCACATAGCAGGCCGCCGTATACTC     |                                                   |                  | 130  |
| Prot | M Q P T P I N Q L V S V V G S Y A A P S S T Q A H S R P P Y T                                                               |                                                   |                  | 31   |
|      |                                                                                                                             | <b>U1</b>                                         |                  |      |
| gDNA | CAAACTCTCTGGTACACCATTTCACGAACGCGATGGTGCATACCTCAGCCACAGTACAGtaagcgtgattttctgccaccgcgtcactgttgcttctacctgcatgaatgtagaacctt     |                                                   |                  | 250  |
| Prot | P N T P G T P F H E R D G A I P Q P Q L Q                                                                                   |                                                   |                  | 52   |
|      | <b>U2AF</b>                                                                                                                 |                                                   |                  |      |
| gDNA | gtctcttttacttttcagAAACATTGTGTGTACAGTAAATCTTGAGATAAGATTGGACTTAAGACGGATAGCTCGGAGCGCCCGTAACGCTGAATACAATCCCAACGATTGCGCCGCGTG    |                                                   |                  | 370  |
| Prot | N I V C T V N L E I R L D L R R I A R S A R N A E Y N P K R F A A V                                                         |                                                   |                  | 86   |
|      |                                                                                                                             | <b>U1</b>                                         |                  |      |
| gDNA | ATTATGCGTATTCGGGAGCCACGAACCACTGCACTCATCTTCTCCTCCGGCAAAATGGTATGCATGGCGCCAAAAGTGA AACGAGGCGCGTCTTGCTGCGCGCAAGTAGCTCGAATA      |                                                   |                  | 490  |
| Prot | I M R I R E P R T T A L I F S S G K M V C T G A K S E N E A R L A A R K Y A R I                                             |                                                   |                  | 126  |
|      | <b>U1</b>                                                                                                                   |                                                   |                  |      |
| gDNA | ATTCAAAGCTGGGGTTCGATgtaagattcacttttcttggcgctcgatatcatattattttcagt tacttcatgtgctcagactcatacttgatggtaattatcctcgaatttttggc     |                                                   |                  | 610  |
| Prot | I Q K L G F D                                                                                                               |                                                   |                  | 133  |
|      |                                                                                                                             |                                                   | <b>U2AF</b>      |      |
| gDNA | ctggaacaaaaaaaaacgtcaacaagtcatacggcattgcacatagcgtatttcccaggacttgagataattaaacttagtttatcgactactttgcttccctgctttaagGCTCGGTTTAA  |                                                   |                  | 730  |
| Prot |                                                                                                                             |                                                   | A R F K          | 137  |
|      |                                                                                                                             | <b>U1</b>                                         |                  |      |
| gDNA | AGGTTTACAATTCAAAACATGGTGGGATCCTGTGACGTGCGGTTCCATATCCGTCTGGAGGGCCTAAACGCTGCACAAAAGAAATTTACCACAgtttcgatctaagcgagataaagatg     |                                                   |                  | 850  |
| Prot | G F T I Q N M V G S C D V R F H I R L E G L N A A Q K K F T T                                                               |                                                   |                  | 168  |
|      | <b>U2AF</b>                                                                                                                 |                                                   |                  |      |
| gDNA | ttcttaagcgagacagcagctgttaaaggagattttcttcttttagTATGAACCCGAGTTGTTTCTGGTCTTGTTTATCGGATGCAAAAGCCCCAAGATTGTCCTTTTGATTTTCGTTTCGG  |                                                   |                  | 970  |
| Prot |                                                                                                                             | Y E P E L F P G L V Y R M Q K P K I V L L I F V S |                  | 193  |
|      | <b>U2AF</b>                                                                                                                 |                                                   |                  |      |
| gDNA | GGAAAACTGCTCTTAAGTGGT agacactttccatacttgactatatttttggttatgaaagcattcgatgaaatgttttgattaacttacactttcgcggccgcagaattgtgtccatt    |                                                   |                  | 1090 |
| Prot | G K I V L T G                                                                                                               |                                                   |                  | 200  |
|      | <b>U1</b>                                                                                                                   |                                                   |                  |      |
| gDNA | atctacttttcatcactttcacaggtGCCAAAGTGCAGATGAGATCTATCAAGCCTTCAATAACATCTATCCGATACTGAAGAAGTTTATGAAATTGGATTTCAGACAAATCGGGACTGCAT  |                                                   |                  | 1210 |
| Prot | A K V R D E I Y Q A F N N I Y P I L K N F M K L D S D K S G L H                                                             |                                                   |                  | 232  |
|      |                                                                                                                             |                                                   |                  |      |
| gDNA | CAGCCAGCACTTACTGGCTTAACTCACACACGTTTATCCGTGTG                                                                                |                                                   |                  | 1251 |
| Prot | O P A L T G -                                                                                                               |                                                   |                  | 233  |

**Figura 17. Estructura del gen que codifica para la TsTBP1.** El TSS corresponde a una A marcada con una flecha. Los sitios putativos de unión a factores de transcripción están escritos arriba de sus secuencias blanco. Los codones de inicio (ATG) y de termino (TAA) están dentro de una caja. Las secuencias donadoras yceptoras gt/ag están marcadas en negritas. Los sitios putativos de splicing U1 y U2AF están subrayados. Los intrones están en minúsculas. Los números a la derecha corresponden a nucleótidos (gDNA) y a los aminoácidos (Prot), respectivamente.

En la figura 18A se muestra un Southern realizado con el ADN del parásito digerido con 4 enzimas de restricción e hibridado con la sonda de DNAC que codifica para la TsTBP1 completa. Se observa un patrón de bandeo sencillo con *Hind*III y *Eco*RI, y un patrón de dos bandas con *Bgl*II y *Bam*HI (enzimas que cortan dentro de la región codificante de TsTBP1). Por otro lado, en la figura 18B se muestra un northern que revela dos bandas de hibridación de 1.0 (débil) y 1.1 kpb (intensa).

Para conocer las diferencias de expresión de TsTBP1 en larva y adulto de *T. solium*, se realizó un PCR de tiempo real utilizando un par de oligonucleótidos específicos para la TsTBP1 (Fig. 18C). Observamos una expresión relativa de  $1.00 \pm 0.08$  Unidades para estadio larvario y  $2.08 \pm 0.13$  Unidades para adulto, los niveles de mRNA de TsTBP1 fueron normalizados usando el gen que codifica para la TsCu/ZnSOD, como gen constitutivo.



**Figura 18. Análisis del gen de TsTBP1.** A) Southern blot mostrando un patrón de bandeo sencillo, B) northern blot mostrando la presencia de dos transcritos, y C) Medida de la expresión relativa de la TsTBP1 en larva y adulto determinada por PCR en tiempo real, donde se observa una diferencia en la producción de transcrito en el estadio larvario y adulto.

### **Análisis del promotor mínimo del gen que codifica para la TsTBP1.**

En la figura 19A se muestra un alineamiento múltiple entre los promotores mínimos de los genes que codifican para TsTBP1 y pAT5. Podemos observar una conservación estructural entre ambos promotores. Las Cajas TATA putativas para el gen de TsTBP1 se pueden observar en -97 (caja TATA -97) y -69 (caja TATA -69) pb; y para el gen pAT5 observamos una caja TATA en -30 pb; el TSS se muestra con una flecha para ambos genes y un DPE putativo con doble subrayado a +27 pb para la TsTBP1 y a +29 para el gen pAT5. Los codones de inicio de traducción (ATG) están resaltados en fondo negro con letras blancas. Las cajas TATA putativas de TsTBP1 fueron probadas por EMSA (Fig 19B). El diseño del experimento fue el siguiente; carril 1: control de corrimiento libre; carril 2: incubación con caja TATA -97 y 5 µg de extracto nuclear de *T. solium*; carril 3: incubación con caja TATA -97 y 10 µg de extracto nuclear de *T. solium*; carril 4: incubación con caja TATA -69 y 5 µg de extracto nuclear de *T. solium*; carril 5: incubación con caja TATA -69 y 10 µg de extracto nuclear de *T. solium*; no se observaron bandas de retardo en ningún carril de este experimento. Adicionalmente, podemos observar en el carril 6 y 7 el control de corrimiento libre y de retardo para la caja TATA del gen pAT5 incubado con 5 µg de extracto nuclear, respectivamente.

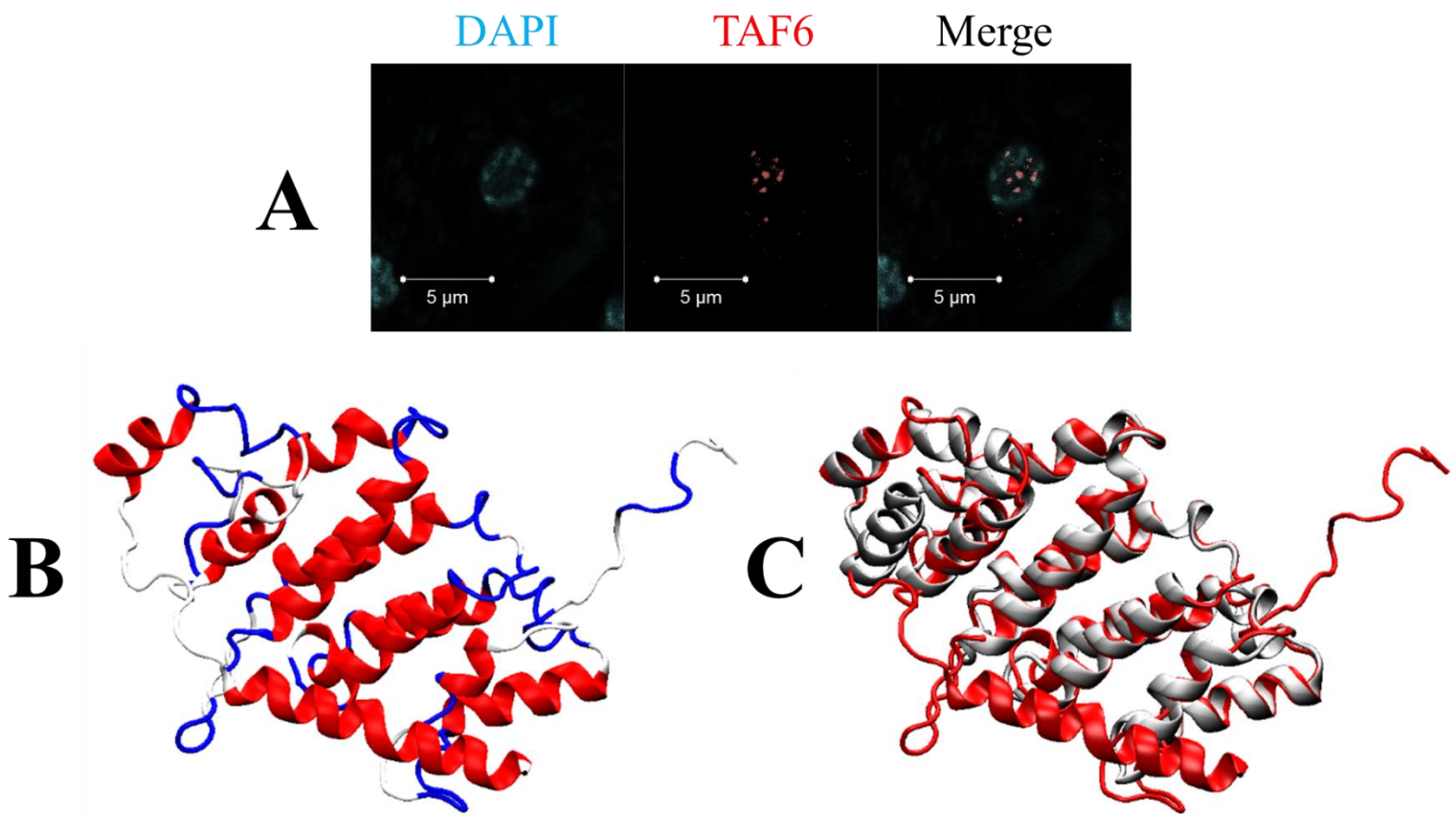
Por otro lado, la figura 19C muestra el EMSA para el sitio DPE putativo del gen que codifica para la TsTBP1. En el carril 1 se observa el control de corrimiento libre; en el carril 2 dos bandas de retardo cuando extractos nucleares son incubados con la sonda de TsTBP1-DPE, en carril 3 y 4 se observa un decremento en la intensidad de la banda cuando se lleva a cabo una competencia homologa con 25X y 50X (respectivamente) de exceso molar de sonda no marcada. Finalmente, en el carril 5 se observa una banda de súper retardo cuando se adiciona un anticuerpo anti-TAF6 a la reacción.

Asimismo, se realizó el mismo EMSA para el sitio DPE putativo presente en el gen pAT5 (Fig 19D), donde se encontró el mismo comportamiento que el experimento anterior, incluida la banda de súper retardo cuando se adiciona un anticuerpo anti-TAF6.

### **Identificación de TAF6 de *Taenia solium*.**

Mediante microscopia confocal se reveló la presencia de TAF6 en el núcleo de cisticercos de *T. crassiceps*. En la figura 20A podemos observar, cuando se hace el sobre-lape de las imágenes, la colocalización de la señal producida por el DAPI (azul, tinción de DNA) y la señal producida por los anticuerpos anti-TAF6 (rojo). Adicionalmente, obtuvimos las secuencias del gen y del DNAc de la base de datos del proyecto genoma de *Taenia solium* (Aguilar-Díaz H, et al 2006; Tsai I J, et al 2013). La secuencia deducida de aminoácidos fue modelada para obtener la estructura de la región COOH-ter de TsTAF6 (TsTAF6-C) solamente, este dominio está conformado por 10 hélices alfa, en 4 repeticiones de estructuras HEAT (Fig 20B). Dicha estructura es similar a los datos cristalográficos del dominio carboxilo terminal del TAF6 de *A. locustae* (AlTAF6-C, PDB id: 4ATG). En la figura 12 C se puede observar la superposición de ambas estructuras y el alto grado de conservación estructural.





**Figura 20. Inmunofluorescencia y modelado molecular del TsTAF6.** A) Localización de TAF6 en cortes de cisticercos de *Taenia crassiceps*, observados mediante microscopia confocal con DAPI, anticuerpos anti-TAF6 y el sobrelape de ambas imágenes mostrando colocalización. B) Representación de listones del modelo de homología 3D de TsTAF6-C de acuerdo a su secuencia deducida de aminoácidos (residuos 255 – 493). El núcleo de la proteína está compuesto por 10 hélices  $\alpha$  en una conformación de 4 repetidos HEAT. C) Superposición de la estructura de rayos X de AtTAF6-C (en gris, residuos 164 – 355) y el modelo 3D por homología de TsTAF6 (rojo).

### **Elementos del promotor mínimo presentes en los genes de la Familia Taeniidae.**

Toda la información disponible de los promotores mínimos de la familia Taeniidae fue recolectada, las secuencias donde el TSS haya sido determinado experimentalmente fue seleccionado para el análisis. Un alineamiento de secuencias nucleotídicas se llevó a cabo, donde se generaron dos grupos: genes que poseen caja TATA y genes que carecen de caja TATA (Fig 21A). En el primer grupo encontramos a los promotores: *T. solium* Actina 5 y 6 (Campos A., et al, 1990; Vaca-Paniagua F. et al, 2009); *T. solium* 2-Cys Peroxiredoxina (Vaca-Paniagua F. et al, 2009); *T. crassiceps* 2-Cys Peroxiredoxina (Vaca-Paniagua F. et al, 2009) y Actina I y II *Echinococcus granulossus* (da Silva C.M., et al, 1993). En el segundo grupo los promotores de Thioredoxina-1 (Jiménez L., et al, 2015); *E. granulosus* Homebox-containig 1 (Esperón P., et al, 2000); *T. solium* Cu,Zn Superóxido dismutasa (Parra-Unda R. et al, 2012) y *T. solium* de laTBP1.

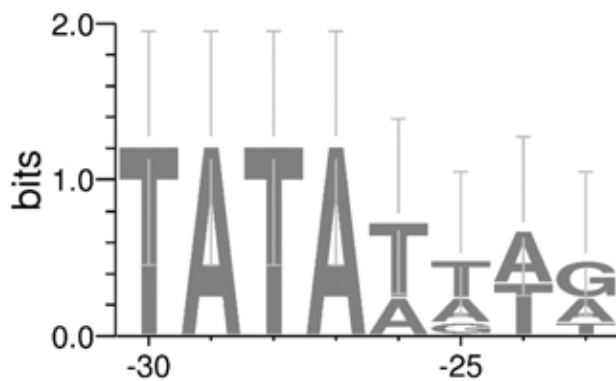
El grupo que contiene caja TATA, se encuentra a -30 pb (aproximadamente) relativos al TSS y el análisis de repetición de nucleótidos (Fig 21B) muestra una secuencia putativa consenso T-A-T-A-T/A-T/A/G-A/T-G/A/T (TATAWDWD) similar al consenso de mamíferos TATAWAAR (Juven-Gershon T., et al., 2008). En ambos grupos, el TSS fue determinado y corresponde a una Adenina (excepto por el de *T. solium* Cu,Zn Superóxido dismutasa, donde el primer nucleótido transcrito es una Citosina), y está rodeado por un elemento Inr. Este elemento varia ampliamente con respecto al consenso de mamíferos (YYANWYY, Juven-Gershon T., et al., 2008), donde el nucleótido que más se conserva es la A<sub>+1</sub>. El consenso propuesto para familia Taeniidae es NBANHBN (Fig. 21C).

Interesantemente, en los promotores de pAT5, TsTRX1 y TsCu/ZnSOD, en una región entre +20 a +33 (aproximadamente), aparece un elemento GGCTGT, en TsPrx aparece un TGCTGT, en TcPrx aparece un GGTTGC y en TsTBP1 aparece un TGTCGA. Estos motivos son similares al DPE en *Drosophila melanogaster* y están localizados en una buena posición para ser funcionales. Un consenso propuesto para el motivo DPE en familia Taeniidae es G/T-G-C/T-T/C-G-T/A/C (Fig. 21D).

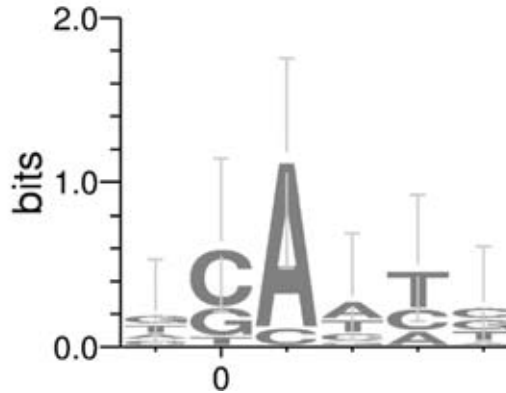
# A

|            | <b>TATA Box</b><br>-30         | <b>Inr</b><br>+1                               | <b>DPE</b><br>+28 +32                                    |
|------------|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| pAT5       | TATATAAA                       | CCGTGGGTCTTCAAGCATCG                           | GCAACTTACGACTTGTGCTGTATCTGTATC                           |
| pAT6       | TATAAGAA                       | CGCTTGGTGGGACACCAGTGG                          | CACACTTGTCCAAGGCCAGCAGTATG                               |
| TsPrx      | TATATTTG                       | GCGGTAAGAGCTGTGCGTGGT                          | GAAATTCATTGTTTGCCTGTAATG                                 |
| TcPrx      | TATATTTG                       | GCGGTAAGAGCTGTGCGTGGT                          | GAAATTCATTGTTTGCCTGTAATG                                 |
| EgactI     | TATAAAAG                       | CCCTAGAAATCACTAGAAGGATC                        | ACTAGAAGGATCACTTTGGTTGAGTGCAGTAGAGAAGACAAATCCTTTGGTGAGCC |
| EgactII    | TATATTTT                       | ACGTCGAAACGGTGAACGTGGCC                        | ATTGATTCTTACTCTTGCTAGCCTCTCG                             |
| TsTrx1     | TGAACGTCGGTGTAAATAAATAAATAATTA | ACAATGCTTTAATGACCTTGA                          | GGCTGTTTAAACAGAGCTCCTTGTAGCACGTTTCAAAGA//ATG             |
| EgHbx1     | CGCACGAGGAGATAAGATAGTGAAACTC   | AGAGAGACGAATCTGGTGACACTCACAAACTACGCGCGGCCACACA | ACTTTTAGTTGGCTGGATG                                      |
| TsCu/ZnSOD | CTAGCAGTGGCATCAAGGATCTGCAGGG   | CTCTCGTTTTTCTTTGGAGTCGCT                       | ATGAAGGCTGTTTGTGTTATGCGAGGGGAGGA                         |
| TsTBP1     | CCGCAACCAAGCAATGTAAGCATCGGC    | AGATCCTCAACAGCAACCCTCCGGGTTT                   | CGTCTGAGATGCAGATGCAGCCAACCCCCATCAA                       |

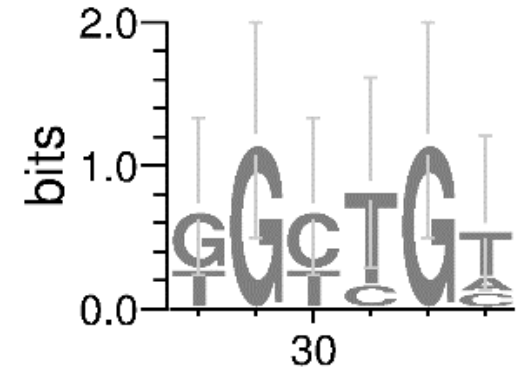
# B



# C



# D



**Figura 21. Análisis de los elementos presentes en los promotores mínimos de varios genes de la familia Taeniidae.** A) Alineamiento de los promotores mínimos de los genes de Actina 5 de *T. solium* (pAT5), Actina 6 de *T. solium* (pAT6), 2-Cys Peroxiredoxina de *T. solium* (TsPrx), 2-Cys Peroxiredoxina de *T. crassiceps* (TcPrx), Actina I de *E. granulosus* (EgactI), Actina II de *E. granulosus* (EgactII), Thioredoxina-1 de *T. solium* (TsTrx1), gen Homebox-containig 1 de *E. granulosus* (EgHbx1), Cu,Zn Superóxido dismutasa de *T. solium* (TsCu,ZnSOD) y TBP1 de *T. solium* (TsTBP1). Representación gráfica de coincidencias en nucleótidos en B) Caja TATA, C) Secuencia iniciadora (Inr) y D) DPE.

## Discusión.

Se encontraron dos clonas para la TsTBP1 que contenían un inserto de aproximadamente 900 pb (pata TsTBP1), después del tamizaje de 45,000 fagos de una biblioteca de DNAC de adulto de *T. solium*, lo que sugiere que el mensajero está representado en un 0.0045%. Este resultado está de acuerdo con lo reportado previamente para *Onchocerca volvulus* e hígado de humano, donde se ha encontrado baja abundancia del RNAm que codifica para TBP1, sin embargo dicha abundancia es suficiente para mantener la transcripción en esos organismos y sugieren que el RNAm para la TsTBP1 es muy estable. (Choy y Green, 1993; Li y Donelson 1993; Schmidt y Schibler, 1995).

Los análisis de la secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia de DNAC mostró que posee los motivos característicos de una TBP1 y un peso molecular predictivo de 26.7 kDa, asimismo mostró que esta puede ser dividida en dos regiones una NH<sub>2</sub>-ter con 48 residuos y una COOH-ter con 190 residuos, esta última resulta altamente conservado entre las especies; y contiene los aminoácidos involucrados en la interacción con el DNA y los TFs. El modelo de la TsTBP1 construido a partir de la estructura primaria por homología, muestra que la región NH<sub>2</sub>-ter de la TsTBP1 presenta una alta homología en longitud, composición de aminoácidos y estructura con la TBP1 de *E. multilocularis* y *E. granulosus*, pero solo un 31% de identidad con HsTBP1 y SsTBP1 (Hospederos de *T. solium*). El modelo de TsTBP1 muestra que el NH<sub>2</sub>-ter está conformado por tres hélices  $\alpha$ . Este dominio es clave para la unión de factores de transcripción especie-específicos, además de que en algunos casos funge como regulador negativo de su propia función (Hernandez N, 1993; Lescure et al, 1994). En contraste la región COOH-ter forma la clásica estructura de “silla de montar”, además posee una hélice  $\alpha$  extra al final compuesta por los aminoácidos SDKSGLHQPALTG. Es de notar que esta hélice  $\alpha$  extra está conservada en *E. granulosus* y *E. multilocularis*, pero su función es desconocida. La superposición de TsTBP1 con las estructuras de rayos-X de TBP1 de humano y levadura mostraron que los dominios de reconocimiento para DNA y a los TFs (TFIIA y TFIIB) están estructuralmente conservados en este dominio. Por otro lado, también se muestra que los aminoácidos que interactúan con DNA forman parches positivos en la isosuperficie de la TsTBP1, los cuales se ha reportado que interactúan con los grupos fosfato del DNA y forman puentes de hidrogeno que estabilizan la interacción TBP1-DNA. Estos hallazgos sugieren que estos sitios en la TsTBP1 son funcionales e indican la relevancia que

el COOH-ter tiene en el reconocimiento del DNA y los TFs para la formación del complejo de preinicio de transcripción.

Los ensayos de western realizados con los anticuerpos anti-pTsTBP1-N y anti-pTTBP1-C, nos permitieron identificar la proteína nativa como una banda de 26 kDa en los extractos nucleares de *T. solium*, el peso molecular obtenido está de acuerdo con el predicho de la secuencia traducida a partir del DNAC obtenido. Los mismos anticuerpos junto con un anticuerpo anti-histona H1 y DAPI, mediante microscopia confocal, nos permitieron localizar TBP1 en el nucleoplasma de las células de cisticercos de *T. crassiceps*. Es de notar que el nucléolo es observado como una región oscura dentro del núcleo con una ligera señal azul producida por DAPI. No se observa señal producida ni por los anticuerpos anti-TsTBP1 o anti-histona H1 en esta región, lo que se puede explicar debido a la alta densidad producida por los RNAr presentes en el nucléolo, lo cual impide la entrada de los anticuerpos, como ya se ha descrito previamente (Masson et al, 1996).

Los EMSA mostraron la unión de TsTBP1 a tres cajas TATA (Adenovirus Major, Ts2-CysPrx y pAT5). Esta observación fue confirmada por un complejo de súper retardo usando el anticuerpo que se une al dominio NH<sub>2</sub>-ter. Por otro lado, los ensayos de competencia cruzada (competencia heteróloga) mostraron que TsTBP1 tiene una mayor afinidad por la caja TATA de gen de pAT5 que por la caja TATA del gen para la Ts2-CysPrx. Esto sugiere que pAT5 tiene una interacción más estable y una mejor formación del complejo de preinicio. También pudimos observar que el anticuerpo anti-pTsTBP1-C puede reconocer epítomos en la hélice  $\alpha$  extra localizada al final de la región COOH-ter. Estos anticuerpos inhibieron la unión de la TsTBP1 a la caja TATA del gen de pAT5, por el contrario ni las IgGs normales de conejo o anti-pTsTBP1-N pudieron inhibir esta unión. De cualquier manera, estudios más profundos deben llevarse a cabo para saber si esta inhibición puede ser especie-específica.

El gen que codifica para la TsTBP1 tiene 4 pequeños intrones con diferentes tamaños. El número de intrones en diferentes genes de TBP1 varían dependiendo de la especie; por ejemplo, no hay intrones en *S. cerevisiae* (Hoffman A., et al., 1990), 1 intrón en *Drosophila melanogaster* (Lira-DeVito L.M., et al., 1995), 4 intrones en *Onchocerca volvulus* (Li S. and Donelson J.E., 1993) y 6 intrones en *Mus musculus* (Sumita K., et al., 1993) y *H. sapiens* (Chalut, et al., 1995). Es de notar que *Oncocerca volvulus* (nemátodo) posee el mismo

número de intrones y tamaño similar que en *T. solium* (céstodo), es probable que esto sea porque ambos son helmintos.

El análisis del promotor proximal revela la presencia de sitios de unión putativos para TF's, como TBP (caja TATA), TAF6/TAF9 (DPE), TAF1/TAF2 (Inr), YY1, AP-1, NF1 y cajas CCAAT. Asimismo, los ensayos tipo Southern y northern sugieren que la TsTBP1 está codificada por un solo gen y que genera un transcrito. La banda de menor intensidad observada en el northern podría corresponder a un transcrito degradado o ser una isoforma generada por splicing alternativo.

Mediante EMSA se confirmó que las cajas TATA putativas localizadas en las posiciones inusuales -97 y -69 pb relativas al TSS, no unen a TsTBP1, contrastando con la caja TATA de pAT5 localizada a -30 pb relativos al TSS que si la une. Estos resultados están de acuerdo con los análisis a promotores mínimos en otros organismos, donde la posición funcional de una caja TATA normalmente está en la posición de -30 a -24 pb (Kadonaga J.T., 2002). Por otro lado, encontramos que el gen que tiene una secuencia Inr, donde el primer nucleótido transcrito corresponde a una Adenina (A<sub>+1</sub>, TSS). Adicionalmente, encontramos que el TSS determinado experimentalmente coincide con el primer nucleótido encontrado en la secuencia de clona del DNAC encontrada.

Interesantemente, en el gen para la TsTBP1 en la región de +27 a +32 pb, se encontró el motivo TGTCGA, que presenta una alta similitud al motivo DPE consenso (A/G-G-A/T-C/T-G/A/C). Los EMSA y súper retardos mostraron que TsTAF6 se une este motivo, indicando que este motivo es funcional. El motivo DPE se encuentra localizado en +28 a +32 pb, y es el sitio de unión a TAF6 y TAF9 (Burke T.W. and Kadonaga J.T., 1996; Burke T.W. and Kadonaga J.T., 1997; Kadonaga J.T., 2002). El DPE es un elemento que está presente en los promotores que carecen de caja TATA, como es el caso del promotor para la TsTBP1. Por otro lado, también este motivo se ha encontrado en otros genes de *T. solium* como el de pAT5, Ts2CysPrx, TsCu/Zn SOD y de la TsTrx-1. Experimentos mostraron que el sitio DPE putativo para el gen de pAT5 también une TsTAF6. Estos hallazgos sugieren que la regulación transcripcional en Taeniidos incluye elementos similares a los encontrados en mamíferos.

Pocos son los promotores proximales de Taeniidos que han sido reportados y caracterizados. Un análisis realizado con aquellos genes donde el TSS ha sido determinado de forma

experimental mostró la presencia de dos grupos de promotores, los que contienen la caja TATA y los que no la tienen. En el primer grupo, la caja TATA está localizada en la región cercana a -30 pb y se obtuvo un motivo consenso TATAWDWD para Taeniidos, lo que muestra un consenso similar con el motivo de mamíferos TATAWAAR. Por otro lado, la secuencia Inr es mucho más variable con respecto al consenso de mamíferos; encontramos que para los tenidos fue BBA<sub>+1</sub>NHBB, en contraste para los mamíferos que es YYA<sub>+1</sub>NWYY. Donde el primer nucleótido transcrito corresponde a una Adenina en la mayoría de los casos (en 8 de 9 secuencias de Inr).

*T. solium* y *E. granulosus* son parásitos que causan la NC y la hidatidosis en humanos, respectivamente. Dichas enfermedades son un problema de salud y económicos en tanto el gobierno de los países en vías de desarrollo no ofrezca soluciones a dichos problemas (Correa et al, 1994; Fleury et al, 2010; Esquivel-Velázquez et al, 2011). Para el control de la taeniosis, solo existen dos medicamentos aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), praziquantel y albendazol. Estos fármacos matan el 65% de los parásitos, y menos del 40% de los pacientes afectados por NC tienen una cura total (Sotelo et al, 1990), además de que el uso de dichos fármacos puede ser peligrosos para pacientes con una gran cantidad cisticercos alojados en zonas importantes para la función del cerebro (Garcia et al, 2011). Por otro lado, *T. solium* ha empezado a desarrollar resistencia contra el albendazol (Chong et al, 1991; Hasan et al, 2011). Por eso, es necesario realizar mayor investigación sobre el diseño de nuevos y eficaces medicamentos.

Por otro lado, la TBP1 es esencial para el desarrollo de los organismos y su carencia lleva a la muerte (Reichelen et al, 2010). Por esto mismo, las diferencias encontradas en las regiones NH<sub>2</sub>-ter y COOH-ter entre las TBP1 de Taeniidos y de los mamíferos hospederos, puede usarse como un blanco potencial para desarrollar nuevas moléculas que nos permitan inhibir la transcripción en estos parásitos. Por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos monoclonales o recombinantes, así como péptidos en contra de factores de transcripción pueden ser una opción, como ya se ha descrito para la inhibición de la triosafosfato isomerasa (TPI) de *T. solium* y *Schistosoma mansoni* (Sanabria-Ayala et al, 2015; Sanabria-Ayala et al, 2013; Harn et al, 1992).

Finalmente, en nuestro conocimiento, este es el primer estudio demostrando que TBP1 está involucrada en transcripción de cestodos y en donde describimos elementos importantes para la formación del PIC como son caja TATA, Inr, DPE.

## Conclusiones.

- Se aisló un DNAC de 919 pb que codifica para una TBP1 de *T. solium*.
- TsTBP1 está constituida por 238 aa.
- El modelado por homología generó un modelo que tiene alta similitud estructural con la TBP1 de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*.
- TsTBP1 posee los aa que interactúan con DNA, y los factores de transcripción TFIIA, TFIIB, NC2 y TAF1.
- Se desarrollaron anticuerpos capaces de reconocer la región NH<sub>2</sub>-ter (anti-pTsTBP1-N) y la región COOH-ter (anti-pTsTBP1-C) específicamente.
- Mediante western blot, usando los anticuerpos anti-pTsTBP1-N y anti-anti-pTsTBP1-C, se identificó la TsTBP1 nativa en extractos de proteínas nucleares de cisticerco.
- Mediante microscopia confocal se localizó TsTBP1 en cortes de tejido de *T. crassiceps*, la cual colocaliza con la región nuclear.
- Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética pudimos determinar que la TsTBP1 nativa es capaz de unir a cajas TATA de los genes que codifican para pAT5 y Ts2Cys-Prx. Cuando se adiciona un anticuerpo anti-pTsTBP1-N se genera un súper retardo, lo cual confirma que es TsTBP1 el que se está uniendo específicamente a dichas cajas TATA.
- El anticuerpo anti-pTsTBP1-C es capaz de inhibir la unión de la TsTBP1 con la caja TATA del gen que codifica para pAT5.
- Se aisló la secuencia genómica que codifica para la TsTBP1 la cual tiene una longitud de 1481 pb y está dividida en cinco exones y cuatro intrones.
- El Southern blot mostró que es un gen de copia única y el northern blot muestra dos transcritos.
- En el promotor mínimo del gen de TsTBP1 se encontró un elemento Inr con una A<sub>+1</sub> como primer nucleótido transcrito y un elemento DPE en la región de +27 a +32 pb.
- El gen de TsTBP1 no posee caja TATA y en su motivo DPE se une TAF6.
- Se analizaron promotores mínimos de la familia Taeniidae y se encontró una alta conservación de la caja TATA y DPE, pero no así de Inr con respecto a mamíferos.

## Referencias

- Aguilar-Díaz H, Bobes RJ, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos MA, et al. The genome Project of *Taenia solium*. *Par Int* 2006; 55: S127 – S130.
- Allan J., Wilkins P., Tsang V., Craig P. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Tropica* 2003, 87: 87 – 93.
- Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohyama Y, Siponen MI, Lundström P, et al. High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(8):1008-1015.
- Beaudoin E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 2000; 10(7):1001-1010.
- Bern C, Garcia HH, Evans C. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis* 1999, 29:1203–1209.
- Burke T.W. and Kadonaga J.T. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 1996; 10: 711 – 724.
- Burke T.W. and Kadonaga J.T. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF<sub>II</sub>60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 1997; 11: 3020 – 3031.
- Burley SK. X-ray crystallographic studies of eukaryotic transcription initiation factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; 351(1339):483-9.
- Butler J. E. F., Kadonaga J. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes and Development* 2002, 16: 2583 – 2592.
- Chalut., Gallois Y., Poterszman A., Monollin V., Egly J.M. Genomic structure of the human TATA-box-binding protein (TBP). *Gene* 1995; 161: 277 – 282.
- Campos A., Bernard P., Fauconnier A., Landa A., Gómez E., Hernandez R., Willms K., Laclette J.P. “Cloning and sequencing of two actine genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1990, 40(1): 87 – 93.
- Cang Y, Prelich G. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12727-32.

- Choy B, Green MR. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 1993; 366: 531-536.
- Chalkley G., Verrijzer P. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF<sub>II</sub>250 – TAF<sub>II</sub>150 complex recognizes the initiator”. *The EMBO J* 1999, 18(17): 4835 – 4845.
- Davidson I. The genetics of TBP and TBP-related factors. *Trends in Bio Sci* 2003, 28(7): 391 – 398.
- Chasman DI, Flaherty KM, Sharp PA, Kornberg RD. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8174-8178.
- Chong MS, Hawkins CP, Cook GC, Hawkes CH, Kocen RS. A resistant case of neurocystercosis. *Postgraduate Medical Journal*, 1991, 67: 577-588.
- Correa M., Flisser-Steinbruch A., Sarti-Gutiérrez E. Teniasis y cisticercosis. En: Valdespino-Gómez J., Del Río-Zolezzi A., Velasco-Castrejón D., Escobar A., Ibáñez-Bernal S., Magos-López E., ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México, D.F.: *Secretaría de Salud* 8:335-345 (1994).
- da Silva C.M., Henrique F.B., Picón M., Gorfinkiel N., Ehrlich R., Zaha A. Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol and Biochem Parasitol* 1993; 60:209 – 219.
- Esperón P., Gorfinkiel N., Garat B., Ehrlich R. Characterisation of the proximal regulatory domain of the *Echinococcus granulosus* homeodomain-containing gene EgHbx1. *Int Jour for Parasitol* 2000; 30: 45 – 49.
- Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Morales-Montor J, Hernández-Bello R and Larralde C. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to focus on the challenge. *J Biomed Biotech* 2011; doi: 10.1155/2011/516042
- Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda Taeniidae) in BALB/cJ mice. *J Parasitol* 2004; 90: 79-84.
- Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becceril Rodríguez P, Larralde C, et al. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(8): e805. doi: 10.1371/journal.pntd.0000805.

- Flisser A., Vargas-Parada L., Laclette P. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia* 2006: 24-33.
- Flisser A., Rodríguez-Canul R., Willingham III A. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Veterinary Parasitology* 2006, 139: 283–292.
- Flisser A., Gyorkos T. Contribution of immunodiagnostic tests of epidemiological intervention studies of cysticercosis/taeniosis in México. *Parasite Immunology* 2007, 29:637–649.
- Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today* 1988, 4(5): 131 – 137.
- García H., Gonzalez A., Evans C., Gilman R. *Taenia solium* cisticercosis. *The Lancet* 2003, 361 (8): 547 – 556.
- Goldberg M. L. (1979). Tesis de doctorado, Universidad de Stanford. Stanford California. USA.
- Gilfillan S, Stelzer G, Piaia E, Hofmann MG, Meisterernst M. Efficient binding of NC2. TATA-binding protein to DNA in the absence of TATA. *J Biol Chem* 2005; 280(7):6222-30.
- Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology* 2004; 11(5): 394 – 403.
- Hasan MS, Basri HB, Hin LP, Stanslas J. Surgical remotion of a cysticercotic granuloma responsible for refractory seizures: A case report. *Surg Neurol Int* 2011; 2: 177. doi: 10.4103/2152-7806.90698.
- Hancock K., Khan A., Williams F., Yushak M., Pattabhi S., Noh J., Tsang V. Characterization of the 8-Kilodalton antigens of *Taenia solium* metacoestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *Journal of Clin Micro* 2003; 41(6): 2577-2586.
- Hancock K., Pattabhi S., Greene R., Yushak M., Williams F., Khan A., Priest J., Levine M., Tsang V. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol & Bio Para* 2004; 133: 115 -124.
- Harn D.A, Gu W, Oligino LD., Mitsuyama M, Gebremichael A, Richter D.. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J Immunol* 1992; 148: 562-567

- Heard D., Kiss T., Filipowicz W. Both Arabidopsis TATA binding protein (TBP) isoforms are functionally identical in RNA polymerase II and III transcription in plant cells: evidence for gene specific changes in DNA binding specificity of TBP. *The EMBO J* 1993; 12(9): 3519 – 3528.
- Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor?. *Genes & Development* 1993; 7: 1291 – 1308.
- Herrera L., Benitez-Bibriesca L., Sotelo J., Ostrosky-Wegman P. La quimioterapia de la cisticercosis. Revisión acerca de su farmacocinética y toxicología. *Gac Med Mex* 1999; 136 (5): 477-489.
- Hoffman A., Horikoshi M., Wang C.K., Schroeder S., Weil P.A., Roeder R.G. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* TFIID gene reveals a strong conservation of functional domains presents in *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Genes Dev.* 1990 4:1141 - 1148.
- Jiménez L, Rodríguez-Lima O, Ochoa-Sánchez A, Landa A. Characterization of a Thioredoxin-1 gene from *Taenia solium* and its encoding product. *Bio Med Research Int*, Article ID 453469, 2015. doi:10.1155/2015/453469
- Juo Z., Chiu T., Lieberman P., Baikarov I., Berk A., Dickerson R. How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol* 1996; 261: 239 – 254.
- Juven-Gershon T., Hsu J. Y., Kadonaga J.T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Biochemical Society Transactions* 2006; 34(6): 1047 – 1050.
- Juven-Gershon T., Jer-Yuan H., Theisen J.W.M., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter – the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 2008; 20: 253 – 259.
- Kadonaga J.T. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Exp. Mol. Med.* 2002; 34(4): 259 – 264
- Kamada K, Shu F, Chen H, Malik S, Stelzer G, Roeder RG, et al. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* 1999; 106(1):71-81.
- Kaminsky, R. G. Taeniasis-cysticercosis in Honduras. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85: 531–534.

- Kim Y, Geiger JH, Hahn S, Sigler PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 1993; 365, 512-520.
- King C., Mahmoud A. Drugs five years later: Praziquantel. *Ann Intern Med* 1989; 110: 290-296.
- Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 1988; 18: 885 – 936.
- Larralde C., De Aluja A. “Cisticercosis guía para profesionales de la salud”. Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura económica. 2008; 15 – 17.
- Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepúlveda J. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Publica Mex* 1992; 34: 197 – 210.
- Lescure A, Lutz Y, Eberhard D, Jacq X, Krol A, Grummt I, et al. The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J.* 1994; 13(5):1166-75.
- Li S., Donelson J.E. The gene for the TATA box-binding protein of *Onchocerca volvulus*. *Mol and Bioch Parasitol* 1993; 61: 321 – 324.
- Lira-DeVito L.M., Burke T.W., Kadonaga J.T. Structure of the genes encoding transcription factor IIB and TATA box-binding protein from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 1995; 153: 203 - 207.
- Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(24):13668-73.
- Masson C., Bouniol C., Fomproix N., Szöllösi M.S., Debey P., Hernandez-Verdun D. Conditions favoring RNA Polymerase I Transcription in permeabilized cells. *Exp Cell Res* 1996; 226: 114-125
- Medina, M., E. Rosas, F. Rubio, and J. Sotelo. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med* 1990; 150: 325–327.
- Meza-Lucas A., Aguilar Rebolledo F. Taeniosis humana por *Taenia solium*. *Rev Mex Patol Clin* 2002; 49 (2): 92-99.
- Michelet L., Fleury A., Siutto E., Kendjo E., Fragoso G., Paris L., Bouteille B. Human neuroxysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. *J of Clin Microbiol* 2011; 49:195-200.

- Molina-López J, Jiménez L, Ochoa-Sánchez A, Landa A. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys Peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J Parasitol* 2006; 92(4): 796-802.
- Nikolov D, Hu SH, Lin J, Gasch A, Hoffmann A, Horikoshi M, et al. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 1992; 360, 40-46.
- Nikolov D., Burley S. 2.1 Å resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP)". *Structural Biol* 1994; 1(9): 621 – 637.
- Ochoa-Sánchez A., Jiménez L., Landa A. The Hamster Model for Identification of specific antigens of *Taenia solium* Tapeworms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011 doi: 10.1155/2011/504959.
- Parra-Unda R, Vaca-Paniagua 525 F, Jiménez L, Landa A. Cu,Zn superoxide dismutase: Cloning and analysis of the *Taenia solium* gene and *Taenia crassiceps* cDNA. *Exp Parasitol* 2012; 130(1): 32 - 38.
- Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* 1999; 13(24):3217-30.
- Pearson R., Guerrant R. Praziquantel: A major advance in anthelmintic therapy. *Ann Intern Med* 1983; 99:195-198.
- Prichard R. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol* 1973; 3: 409 – 417.
- Reichelen M.J., Murakami K.S., Ferry J.G. Functional analysis of three TATA binding protein homologs in *Methanosarcina acetovirans*. *J Bacteriol* 2010; 192(6): 1511-1517.
- Reyes-Juárez JL, Juárez-Rubí R, Rodríguez G, Zarain-Herzberg A. Transcriptional analysis of the human cardiac caldesmon gene in cardiac and skeletal myocytes. *J Biol Chem* 2007; 282: 35554-35563.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, A.N.D.T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 Cold Spring Harbor, New York.
- Sanabria-Ayala V, Belmont I, Abraham L. Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPi): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity. *Parasitol Res* 2015; 114: 55-64.

- Sanabria-Ayala V, Medina-Flores Y, Zavala-Carballo A, Jiménez L, Landa A. Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*. *Exp Parasitol* 2013; 134: 495-503.
- Sarti E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Sal Pub Mex* 1997; 39 (3): 225-231.
- Sarti E, Schantz PM, Plancharte A, Wilson M, Gutierrez R, Lopez AS, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J TropMed Hyg* 1992; 46: 677-684.
- Schmidt E.E., Schibler U. High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. *Development* 1995; 121: 2373-2383.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
- Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Laclette J., Sotelo J., Aluja A., Vargas L., Larralde C. *Taenia solium* disease in human and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infections* 2002; 2: 1875 – 1890.
- Sikorski T. W., Buratowski S. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Current Opinion in Cell Biology* 2009; 21: 344 – 351.
- Sloan L., Schneider S., Rosenblatt J. Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis. *J Clin Micro* 1995; 33(12): 3124 – 3128.
- Smale S. T., Kadonaga J. T. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 2003; 72: 449 – 479.
- Sotelo J, del Brutto OH, Penagos P, et al. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 1990; 237: 69–72.
- Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. Cysticercosis of the central nervous system: how should it be managed? *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24:423–427.
- Sumita K., Makino Y., Katoh K., Kishimoto T., Muramatsu M., Mikoshiba K., Tamura T. Structure of a mammalian TBP (TATA-binding protein) gene: isolation of the mouse TBP genome. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:2769.

- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genome of four tapeworm species reveal adaptation to parasitism. *Nature* 2013; 496(7443):57 - 63.
- Tsang V., Brand J., Boyer A. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infec Dis* 1989; 159(1): 50 – 59.
- Vaca-Paniagua F. (2009). Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vaca-Paniagua F., Parra-Unda R., Landa A. Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 2009; 105(3): 781-787.
- Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A. *Taenia solium*: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(5):393-9.
- Vargas-Parada L., Laclette J.P. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res* 2003; 89(5): 375 – 378.
- Villalobos-Perozo R. Clinical manifestations in the presentation of neurocysticercosis. *Kasmera* 2003; 31(2): 80 – 85.
- Willms K., Vargas-Parada L., Laclette J. Biología del parásito en: Larralde C., De Aluja A. Cisticercosis guía para profesionales de la salud. Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura económica. 2008: 19 - 40.
- Wilkins P., Allan J., Verastegui M., Acosta M., Eason A., Garcia H., Gonzalez A., Gilman R., Tsang V. Development of a serological assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(2): 199 – 204.

# ANEXOS

RESEARCH ARTICLE

# Molecular Cloning of a cDNA Encoding for *Taenia solium* TATA-Box Binding Protein 1 (TsTBP1) and Study of Its Interactions with the TATA-Box of Actin 5 and Typical 2-Cys Peroxiredoxin Genes

Oscar Rodríguez-Lima<sup>1</sup>, Ponciano García-Gutierrez<sup>2</sup>, Lucía Jiménez<sup>1</sup>, Ángel Zarain-Herzberg<sup>3</sup>, Roberto Lazzarini<sup>4</sup>, Abraham Landa<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, **2** Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa, México D.F., México, **3** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, **4** Departamento de Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa, México D.F., México

\* [landap@unam.mx](mailto:landap@unam.mx)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Rodríguez-Lima O, García-Gutierrez P, Jiménez L, Zarain-Herzberg Á, Lazzarini R, Landa A (2015) Molecular Cloning of a cDNA Encoding for *Taenia solium* TATA-Box Binding Protein 1 (TsTBP1) and Study of Its Interactions with the TATA-Box of Actin 5 and Typical 2-Cys Peroxiredoxin Genes. PLoS ONE 10(11): e0141818. doi:10.1371/journal.pone.0141818

**Editor:** Geoffrey N. Gobert, Queensland Institute of Medical Research, AUSTRALIA

**Received:** May 21, 2015

**Accepted:** October 13, 2015

**Published:** November 3, 2015

**Copyright:** © 2015 Rodríguez-Lima et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT IN215714-3); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-176925). ORL was supported by a scholarship (240037) from CONACyT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

TATA-box binding protein (TBP) is an essential regulatory transcription factor for the TATA-box and TATA-box-less gene promoters. We report the cloning and characterization of a full-length cDNA that encodes a *Taenia solium* TATA-box binding protein 1 (TsTBP1). Deduced amino acid composition from its nucleotide sequence revealed that encodes a protein of 238 residues with a predicted molecular weight of 26.7 kDa, and a theoretical pI of 10.6. The NH<sub>2</sub>-terminal domain shows no conservation when compared with to pig and human TBP1s. However, it shows high conservation in size and amino acid identity with taeniids TBP1s. In contrast, the TsTBP1 COOH-terminal domain is highly conserved among organisms, and contains the amino acids involved in interactions with the TATA-box, as well as with TFIIA and TFIIB. *In silico* TsTBP1 modeling reveals that the COOH-terminal domain forms the classical saddle structure of the TBP family, with one  $\alpha$ -helix at the end, not present in pig and human. Native TsTBP1 was detected in *T. solium* cysticerci's nuclear extract by western blot using rabbit antibodies generated against two synthetic peptides located in the NH<sub>2</sub> and COOH-terminal domains of TsTBP1. These antibodies, through immunofluorescence technique, identified the TBP1 in the nucleus of cells that form the bladder wall of cysticerci of *Taenia crassiceps*, an organism close related to *T. solium*. Electrophoretic mobility shift assays using nuclear extracts from *T. solium* cysticerci and antibodies against the NH<sub>2</sub>-terminal domain of TsTBP1 showed the interaction of native TsTBP1 with the TATA-box present in *T. solium* actin 5 (pAT5) and 2-Cys peroxiredoxin (Ts2-CysPrx) gene promoters; in contrast, when antibodies against the anti-COOH-terminal domain of TsTBP1 were used, they inhibited the binding of TsTBP1 to the TATA-box of the pAT5 promoter gene.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** anti-pTsTBP1-C, antibodies raised against synthetic peptide of COOH-ter; anti-pTsTBP1-N, antibodies raised against synthetic peptide of NH<sub>2</sub>-ter; COOH-ter, Carboxyl terminal domain; NH<sub>2</sub>-ter, Amino terminal domain; pAT5, *T. solium* actin 5 gene; PIC, Pre-initiation complex of transcription; pTsTBP1-C, peptide of COOH-ter; pTsTBP1-N, peptide of NH<sub>2</sub>-ter; RMSD, Root-mean-square deviation; TAF, TBP-associated factor; TBP, TATA-box binding protein; Ts2-CysPrx, *Taenia solium* 2-Cys peroxiredoxin gene; TSS, Transcription start site; TsTBP1, *Taenia solium* TATA-box binding protein 1.

## Introduction

Transcription is the process to generate RNA from a gene, and it is carried out by different RNA polymerases. It is known that some genes possess the TATA-box motif in its core promoters [1]. In them, the TATA-box binding protein (TBP) interacts directly with DNA through this motif, which is typically located at -25 to -35 base pair (bp) relative to the Transcription Start Site (TSS) and has the consensus sequence TATA(A/T)A(A/T) [2, 3]. TBP is an important protein that, together with other general transcription factors (GTFs), forms the pre-initiation complex (PIC) allowing the polymerase to bind the promoter genes and initiate the transcription process. TBP is a component of SL1, TFIID, and TFIIB complexes, which are used by RNA polymerases I, II and III, respectively [4–6].

The majority of genes transcribed by all three RNA polymerases lack TATA-box in their promoters; nevertheless, TBP interacts with TBP-associated factors (TAFs) to form the PIC for the RNA Polymerase binding [7–9].

TBPs structure consists of an NH<sub>2</sub>-terminal domain (NH<sub>2</sub>-ter), necessary for species-specific transcription factor binding, with variable amino acid residues and is non-conserved among species, and a COOH-terminal domain (COOH-ter) that is highly conserved and is formed by ~180 residues [6, 10]. This domain presents the classical saddle structure formed by 10-anti parallel  $\beta$ -strands that form a concave domain that contains all the amino acids implicated in DNA binding and four amphipathic  $\alpha$ -helices that form the convex domain, which has the amino acids needed for the interaction with some GTF's [11].

Although information exists about gene core promoter sequences, genomes, and transcriptomes of *Echinococcus ganulosus*, *E. multilocularis*, *Taenia crassiceps*, and *T. solium*, little is known about the role that TBPs and other transcription factors are playing in the transcription process in the *Taeniidae* family [12–20]. Therefore, the aim of this project was to clone and characterize the cDNA encoding a TATA-box binding protein 1 of *T. solium* (TsTBP1) and to study the interaction of this protein with the TATA-box in the core promoter of actin 5 (pAT5) and typical 2-Cys peroxiredoxin (Ts2-CysPrx) genes of *T. solium*.

## Material and Methods

### Biological materials

Cysticerci from *T. solium* were dissected from skeletal muscle of a naturally infected swine, acquired of Temixco, Morelos, Mexico. Located in geographical coordinates 18°51'16" North latitude and 99°13'38" West longitude. For infected swine identification, several backyard-breeding animals were inspected by visual analysis and tongue palpation looking for sub-epithelial cysticerci. Infected swine were selected and slaughtered for the purposes of this study. *T. crassiceps* WFU strain cysticerci were obtained from experimentally infected mice, briefly, six weeks old female BALB/cJ mice were infected with 10 WFU strain *T. crassiceps* cysticerci in peritoneal cavity using a 20G needle and euthanized 90 days after cysticerci inoculation [21]. The mice were maintained in groups of six mice with water and hormone-additives-pesticides free food *ad libitum*. They were monitored every day, all mice presented good health until sacrifice at 90 days. Cysticerci obtained were washed 4 times with sterile ice-cold phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), and used for experiments.

### Ethics statement

Swine were slaughtered by desensitization and posterior bleeding, according to the Official Mexican Norm: NOM-033-ZOO-1995 for humanitarian sacrifice of domestic and wild animals

and the procedure inspected by veterinarian staff. All mice were reproduced and maintained in a pathogen-free and controlled environmental conditions ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$  temperature and  $55 \pm 5\%$  humidity) and 12 h light/dark cycle at Facultad de Medicina, UNAM animal care facilities. Additionally, animals were euthanized by using i.v. pentobarbital (210 mg/kg), according to the Official Mexican Norm: NOM-062-ZOO-1999 for production, care and use of laboratory animals. All protocols were in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the NIH, USA. The research protocol was approved by Research and Ethic Committee of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (007–2012).

### *Taenia solium* TBP1 cDNA cloning

TsTBP1 probe was generated using the Super Script One Step RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), using 1  $\mu\text{g}$  of *T. solium* cysticerci's total RNA and primers designed for two well-conserved sequences in TBPs (TBP5': RNAEYNP and TBP3': YEPELFP). Program for cDNA synthesis was  $45^\circ\text{C}$  for 30 min, and for PCR amplification, 30 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 1 min,  $52^\circ\text{C}$  for 30 sec,  $72^\circ\text{C}$  for 1min and a cycle for final extension of  $72^\circ\text{C}$  for 15 min. The fragment obtained was purified, cloned into pCRII vector (Invitrogen), and sequenced on an automated DNA sequencer ABI Prism model 373 (Applied Biosystems, Grand Island, NY). The probe obtained was used to isolate a full clone of TsTBP1 by screening 45,000 clones from the *T. solium* adult cDNA library constructed in  $\lambda\text{ZAP II}$  and carried out as previously described [22]. Inserts of positive clones were amplified by PCR, cloned into pCRII, and sequenced as before. Bioinformatics analysis such as the translation of nucleotide sequence and multiple alignments were carried out using the PCGENE and Clustal X programs.

### Molecular modeling

The structure for the deduced sequence of TsTBP1 was modeled with the *Homology Model* implemented in MOE software package (*Molecular Operating Environment* 2013.08; Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) using the human TFIIA/TBP/DNA complex X-ray structure as template (PDB ID: 1NVP). The potential force field was Amber12:EHT with a reaction field treatment of solvation electrostatics. Ten models were built as a result of the permutational selection of different loop candidates and side chain rotamers. The best intermediate model, according to the GB/VI function score implemented in MOE, was subjected to further optimal energy minimization in explicit solvent using a Root-mean-square deviation (RMSD) gradient equal to 0.01. Prior, *Protonate 3D* implemented in MOE was used to assign the protonation state of ionizing residues. The geometric quality of the final homology model was verified by Ramachandran plot. The Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) program [23] was used within PyMOL to display the results of the calculations as an electrostatic potential molecular surface. The ionic strength was set to 100 mM of NaCl.

### Antibody production

Two different peptides were synthesized, one at the beginning of the  $\text{NH}_2$ -ter and designed as pTsTBP1-N (MQPTPINQLVSVVGSYAAPSSTQAHSRPPYTPNTPG), and the other at the end of the  $\text{COOH}$ -ter and designed as pTsTBP1-C (VRDEIYQAFNNIY-PILKNFMKLDSDKSGLHQPALTG). Rabbit polyclonal antibodies were produced by four subcutaneous immunizations every 2 weeks, using 100  $\mu\text{g}$  of each synthetic peptide mixed with saponin (10  $\mu\text{g}$ ). The rabbits were bled 7 days after the last immunization, and the obtained sera were frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . The immunoglobulin G (antibodies) fraction was purified from

rabbit sera by affinity chromatography with protein G-agarose (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO), titer and specificity of antibodies were determined by ELISA and western blot.

### *Taenia solium* nuclear extract

*Taenia solium* cysticerci (10 g) were homogenized in buffer A (20 mM HEPES, 20 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% Glycerol, 0.5% Nonidet P-40, 0.2 mM EDTA, 1 μM Pepstatin, 0.6 μM Leupeptin, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) with Ultra Turrax T8 (IKA, Wilmington, NC). The suspension was incubated 10 min and centrifuged at 10,000xg for 20 min. The pellet was suspended in 4 ml of buffer A, added to a tube containing 10 ml Ficoll solution (5.7%), and centrifuged at 3,300xg for 15 min. The pellet was resuspended in 1 ml of buffer B (20 mM HEPES, 1.2 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25% Glycerol, 1 μM Pepstatin, 0.6 μM Leupeptin, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) and gently shaken for 45 min. The suspension was centrifuged at 14,000xg for 30 min; the supernatant was quantified by the Bradford method, aliquoted and stored at -20°C until use. All steps of the protocol were carried out at 4°C. Nuclear extract (2.5 μg/mm of gel) integrity was determined in a 10% SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol and stained with Coomassie blue.

### TsTBP1 identification by western blot and immunofluorescence

For western blot, 5 μg of nuclear extract per mm of gel were transferred to PVDF membranes. Membranes were incubated with rabbit anti-pTsTBP1-N, anti-pTsTBP1-C antibodies, and normal rabbit IgG at 1:100 dilution, washed with PBS-0.3% Tween and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG. Bound antibodies were revealed with 3,3'-diaminobenzidine and 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cysticerci from *T. crassiceps* were embedded in Tissue-Freezing Medium (Triangle Biomedical Science, Durham, NC), frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. Frozen sections of 6 to 8 μm thick were prepared and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Samples were permeabilized with 0.01% (v/v) Triton-X 100 for 30 min, and blocked with 3% (w/v) BSA in PBS for 30 min; sections were incubated overnight with anti-pTsTBP1-N, anti-histone H1-sc-393530 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), and normal mouse and rabbit IgG were used as negative controls (all antibodies were diluted 1:100). Sections were rinsed three times with PBS and incubated 60 min at room temperature (rt) with Alexa 568-conjugated anti-mouse IgG and Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (diluted 1:200 in PBS-3% BSA, Life Technologies, Grand Island, NY). Sections were rinsed three times with PBS and incubated 5 min at rt with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Sections were rinsed as before and mounted on a glycerol-PBS solution (9:1). Single plane images were obtained with a confocal microscope LSM-META-Zeiss Axioplan 2. Co-localization analysis was performed using the ZEN 2010 program version 6.0 (Carl Zeiss, Pleasanton, CA).

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

To generate complementary double-stranded DNA oligonucleotide (dsDNA) probes, both oligonucleotides were mixed at 1:1 molar ratio, heated to 95°C for 5 min and gradually cooled to rt. dsDNA probes were labeled with [γ-<sup>32</sup>P]ATP (Perkin Elmer, Boston, MA) using T4 polynucleotide kinase. Binding reactions were performed by pre-incubating at rt: 17.5 fmol of each labeled probe, 1 μg of poly(dI-dC) and 10 μg of nuclear extract in binding buffer (20% glycerol; 2.5 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 2.5 mM DTT). For competition, 25, 50 and 100-fold molar excess of unlabeled dsDNA probe was added to the binding reaction. The reactions were incubated 30 min at rt. For super-shift assay, 1 μg of anti-pTsTBP1-N antibodies were added to the reaction after adding the nuclear extract, and incubated for 30 min at rt. All reactions were finished with addition of gel-loading buffer (15%

Ficoll, 0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol in TBE). The complex formed was separated on a non-denaturing 5% polyacrylamide gel and visualized by autoradiography of the dried gel [24]. For densitometric analysis, the EMSA films were digitized using a scanner and analyzed with the ImageJ program [25]. Statistical significance was defined as two tailed Student's t-test,  $P < 0.005$ , and results are present as percentage mean  $\pm$  SD of the shifted band.

To determine, if anti-pTsTBP1-C is able to inhibit the binding of TsTBP1 to the TATA-box of the pAT5 gene promoter, EMSA was performed as described above, but using a biotin-labeled DNA probe (TATA-box). The probe was labeled with the Labeling Kit (Pierce, Grand Island, NY). Briefly, EMSA was carried out as follows: for supershift assay, 17.5 fmol of TATA-box of pAT5-biotin-labeled was incubated at rt with 1  $\mu$ g of poly(dI-dC) and 10  $\mu$ g of *T. solium* nuclear extract in binding buffer for 30 min, then, 1  $\mu$ g of anti-pTsTBP1-C antibodies was added to the reaction and incubated 30 min. To inhibit the binding of TsTBP1 to TATA-box of pAT5, 10  $\mu$ g of *T. solium* nuclear extract were incubated with 1  $\mu$ g of anti-pTsTBP1-C antibodies, 1  $\mu$ g of poly(dI-dC) in binding buffer for 30 min, and then, 17.5 fmol of pAT5 TATA-box biotin-labeled was added and incubated at rt for 30 min more. Additionally, normal rabbit IgG and anti-pTsTBP1-N antibodies were used instead of anti-TsTBP1-C antibodies, for supershift and inhibition reactions, as a control. Shift reaction with 17.5 fmol of TATA-box of pAT5-biotin-labeled was carried out as described above.

## Results

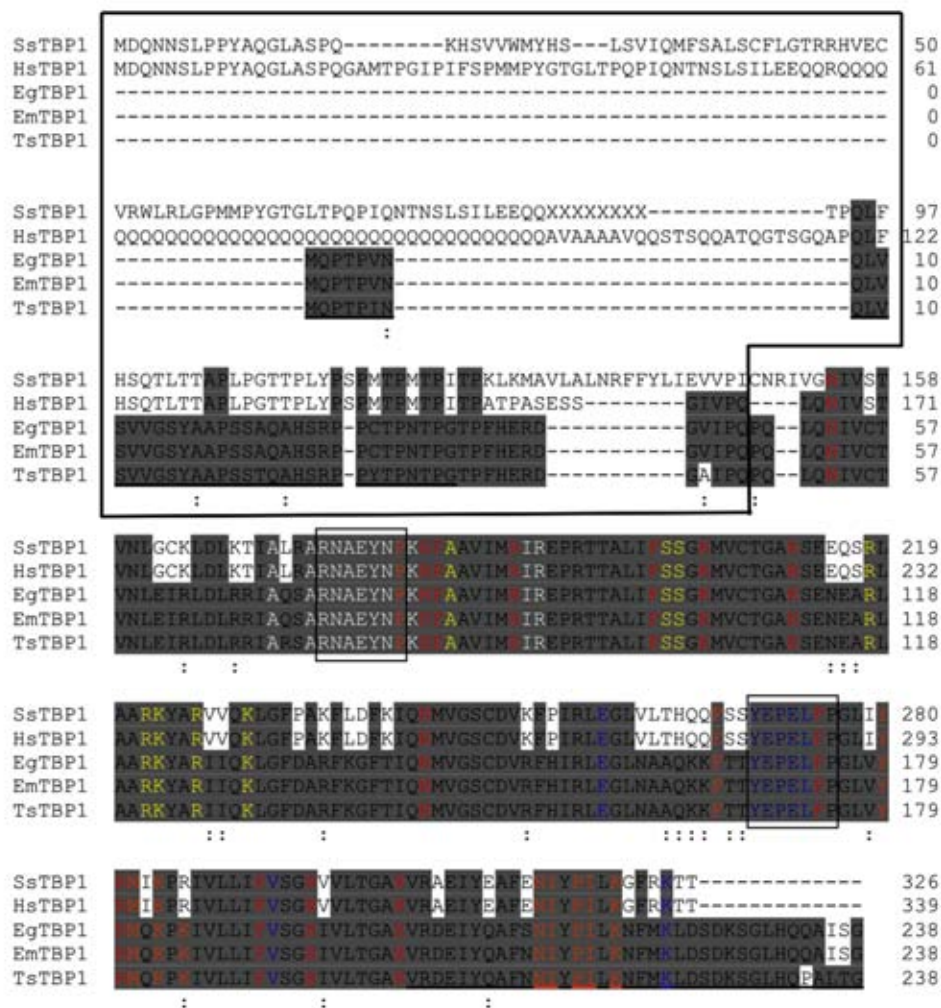
### Nucleotide sequence analysis of TsTBP1 cDNA

A 306 bp probe homologous to TsTBP1 was produced through RT-PCR using total RNA from *T. solium* cysticerci and two degenerate oligonucleotides from well-conserved TBP motifs (see Fig 1). This cDNA probe allowed us to isolate two identical phage clones from a cDNA library of adult stage *T. solium*, containing the complete coding sequence for TsTBP1. The cDNA sequence spans 919 bp, with an open reading frame (ORF) from position 37 bp to 751 bp, where the start codon codes for methionine and the stop codon correspond to TAA. The clone possesses a 36 bp 5'-UTR and a 168 bp 3'-UTR, which contains a putative polyadenylation signal at position 880 bp (AGTAGA) [26] and a tail of 18 adenosines. The ORF of the obtained cDNA encodes a polypeptide of 238 amino acids, with a predicted  $M_r$  of 26.7 kDa and a theoretical pI of 10.6. The nucleotide sequence TsTBP1 cDNA and its deduced amino acid sequence are deposited in GenBank under the accession KR673321.

A multiple primary sequence alignment (Fig 1) shows that TsTBP1 has a high identity with TBP1 from *E. multilocularis* (97%, EmTBP1) and with *E. granulosus* (96%, EgTBP1); whereas less identity was observed with *Homo sapiens* TBP1 (64%, HsTBP1) and *Sus scrofa* TBP1 (62%, SsTBP1). The NH<sub>2</sub>-ter is about two thirds shorter and highly conserved among EgTBP1, EmTBP1, and TsTBP1 (92%) and less conserved in TBP1s from pig and human (31%). Moreover, its COOH-ter presents all important residues involved in the recognition of DNA (i.e., N<sup>53</sup>, R<sup>82</sup>, F<sup>83</sup>, R<sup>89</sup>, F<sup>100</sup>, K<sup>104</sup>, K<sup>111</sup>, N<sup>143</sup>, F<sup>174</sup>, R<sup>180</sup>, F<sup>191</sup>, K<sup>195</sup>, K<sup>202</sup>) and binding of GTFs, such as TFIIA (i.e., A<sup>70</sup>, A<sup>73</sup>, R<sup>74</sup>, N<sup>75</sup>, A<sup>76</sup>, E<sup>77</sup>, Y<sup>78</sup>, N<sup>79</sup>, K<sup>81</sup>, R<sup>89</sup>, I<sup>90</sup>, R<sup>91</sup>), TFIIB (i.e., E<sup>157</sup>, Y<sup>169</sup>, E<sup>170</sup>, P<sup>171</sup>, E<sup>172</sup>, L<sup>173</sup>, R<sup>180</sup>, V<sup>192</sup>, K<sup>223</sup>), NC2 (i.e., P<sup>80</sup>, R<sup>82</sup>, F<sup>166</sup>, Y<sup>179</sup>, R<sup>180</sup>, M<sup>181</sup>, K<sup>183</sup>, K<sup>185</sup>, N<sup>213</sup>, I<sup>214</sup>, P<sup>216</sup>, I<sup>217</sup>, K<sup>219</sup>), and TAF1 (i.e., A<sup>70</sup>, R<sup>74</sup>, N<sup>75</sup>, E<sup>77</sup>, Y<sup>78</sup>, A<sup>84</sup>, R<sup>91</sup>, S<sup>101</sup>, S<sup>102</sup>, R<sup>117</sup>, R<sup>121</sup>, K<sup>122</sup>, R<sup>125</sup>, K<sup>129</sup>) [27–35]. Likewise, a remarkable feature is that there are 13 additional residues in the taeniids that there are not present in pig and human TBP1s.

### In silico modeling of the TsTBP1 structure

Fig 2A shows a homology model of TsTBP1 constructed according to the amino acid sequence deduced from cDNA and using the X-ray structure of the human TFIIA/TBP/DNA complex

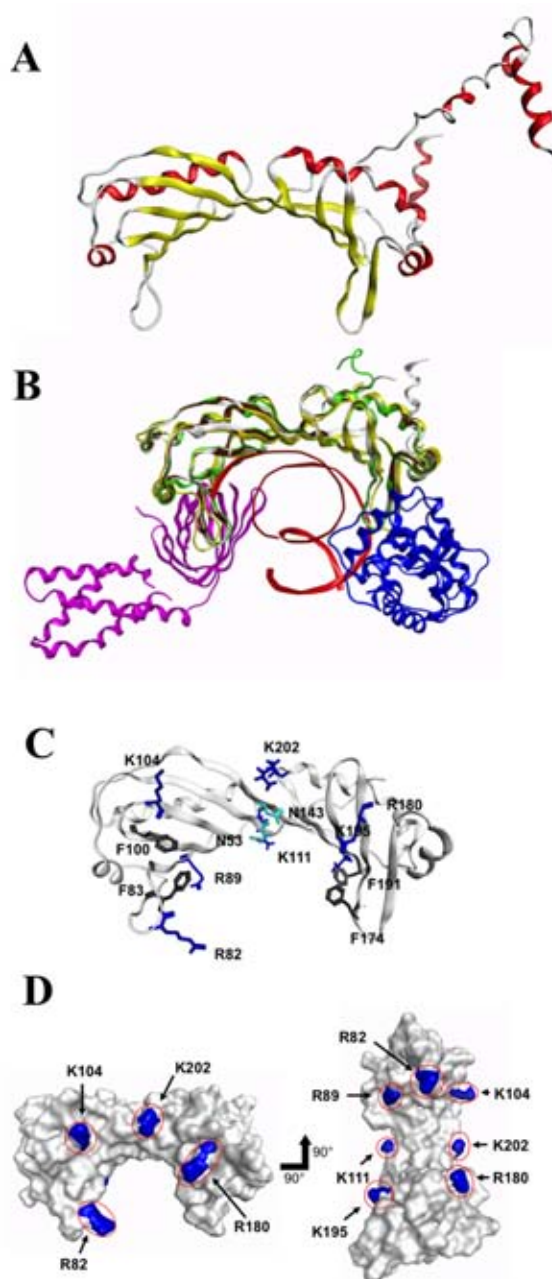


**Fig 1. Multiple amino acid alignment of TATA-box binding protein 1 from *T. solium* (TsTBP1).** TsTBP1 was aligned with *Sus scrofa* TBP1 (SsTBP1, GeneBank ID: XP\_003361466.1), *Homo sapiens* TBP1 (HsTBP1, GeneBank ID: NP\_003185.1), *E. granulosus* TBP1 (EgTBP1, GeneBank ID: CDS17003.1), *E. multilocularis* TBP1 (EmTBP1, GeneBank ID: CDJ04746.1). The NH<sub>2</sub>-ter is enclosed in a box, and the remaining amino acid sequence corresponds to the COOH-terminal domain (COOH-ter). Identical amino acids are highlighted in gray background. Important residues that bind TATA-box are in red letters; transcription factor II A (TFIIA) in white; transcription factor II B (TFIIB) in blue; negative cofactor 2 (NC2) in orange and TBP1-associated factor 1 (TAF1) in yellow. Amino acid sequences used to produce the TsTBP probe and the synthetic peptides pTsTBP1-N and pTsTBP1-C are in small boxes and underlined, respectively. Letter X on *S. scrofa* TBP1 sequence means amino acids not identified. The symbols under the amino acids indicate: (-) absence and (:) homology of amino acids.

doi:10.1371/journal.pone.0141818.g001

as template (PDB ID: 1NVP). To evaluate the quality of the resulting model, the Ramachandran plot was constructed, and its inspection shows that there were no amino acids in disallowed regions. The structure obtained for COOH-ter consists of two nearly identical subdomains that adopt a quasi-symmetric  $\alpha/\beta$  structure, resembling a saddle. The concave underside of the saddle is highly curved, and constituted by 10-anti parallel  $\beta$ -strands, and the convex upper surface of the saddle consists of five  $\alpha$ -helices, both contain important conserved

amino acids for the recognition of DNA and GTFs, previously mentioned. Additionally, random coils and three small  $\alpha$ -helices compose the  $\text{NH}_2$ -ter of TsTBP1. Because,  $\text{NH}_2$ -term is widely divergent in size and sequence across species [6]; moreover; its high mobility, has make



**Fig 2. Structural analysis of TsTBP1.** A) Ribbon representation of a 3D-homology model for TsTBP1 from the deduced amino acid sequence. It shows a conserved  $\text{COOH}$ -ter and non-conserved  $\text{NH}_2$ -ter of TBP structure ( $\beta$ -strands are in yellow,  $\alpha$ -helices are in red). B) Superposition of the  $\text{COOH}$ -ter of TsTBP1 model (in white) with X-ray structure of *Saccharomyces cerevisiae* TBP1 (in yellow, PDB ID 1RM1), human TFIIIB/TBP/DNA complex (in blue, green, and red, PDB ID: 1VOL) and human TFIIA/TBP1 complex (in pink and brown, PDB ID 1NVP). C) Localization in the TsTBP1 model of amino acids involved in DNA recognition (in dark blue) and phosphate groups (gray and cyan). D) Solvent-accessible surface of the  $\text{COOH}$ -ter TsTBP1 model showed in front and bottom views. The blue patches show the positive density produced by the basic amino acids involved in DNA binding.

doi:10.1371/journal.pone.0141818.g002

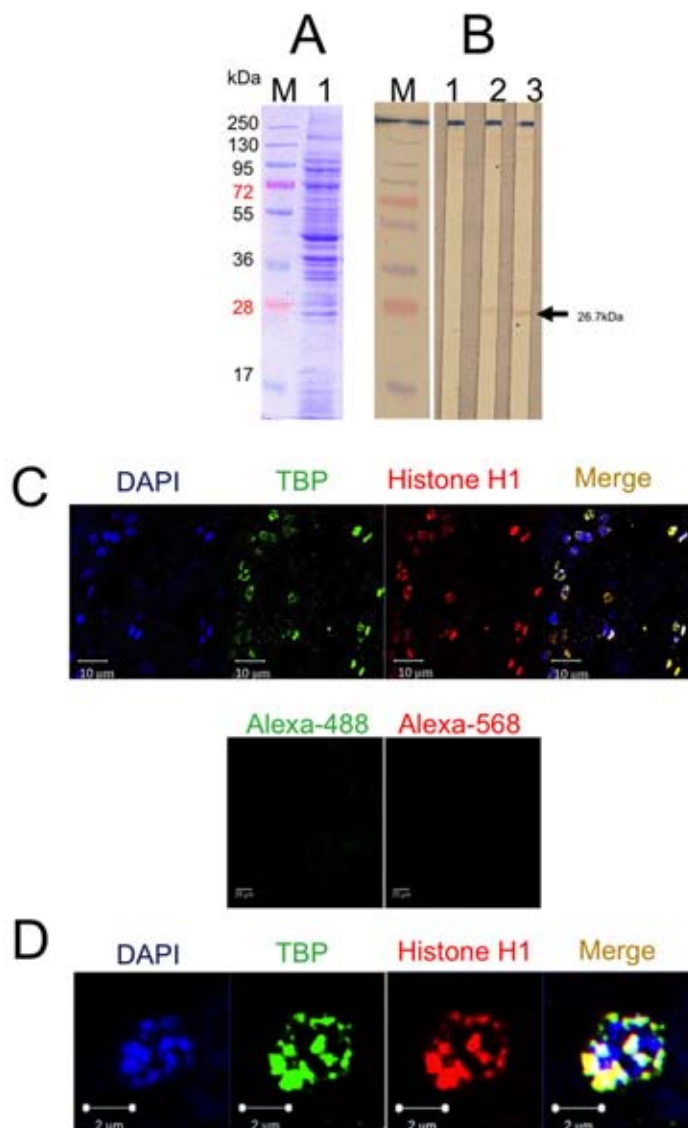
difficult to determine its structure by X-ray diffraction [11, 36]. Therefore this domain was deleted for subsequent analysis. Fig 2B shows the superposition of the COOH-ter of TsTBP1 model with 3D structures of yeast TBP1 (PDB ID: 1TBP), human TFIIB/TBP/DNA complex (PDB ID: 1VOL) and human TFIIA/TBP/DNA complex (PDB ID: 1NVP) where a high grade of structure similarity is observed in the core proteins. The RMSD values (only considering C $\alpha$ ) obtained were 1.32, 1.04, and 0.52 Å, respectively (Fig 2B). Fig 2B also shows the regions of interaction of TsTBP1 (white), Human TBP1 (green and brown, HsTBP1) and *Saccharomyces cerevisiae* TBP1 (yellow, ScTBP1) with TFIIA (pink structure), TFIIB (blue structure), and DNA (in red). Noteworthy, the regions of interaction are structurally conserved and fit with the crystallographic data for these GTFs and DNA. As mentioned before, all of the important residues for interaction are conserved suggesting a strong interaction. Moreover, an extra  $\alpha$  helix at the end of TsTBP1 of the COOH-ter was identified, which is absent in HsTBP1, and ScTBP1. Fig 2C shows the TsTBP1 COOH-ter structural model revealing the distribution and localization on the concave underside of the residues involved in the interaction with DNA or TATA-box motif (Fig 1). In the TPB/DNA complex from yeast (PDB ID 1YTB), a string of lysine and arginine residues (colored dark blue) that interacts with the phosphate groups of the DNA; four phenylalanine residues (colored in black) that jam into the DNA minor groove forming the kinks that bend the DNA. There are also two symmetrical asparagine residues that form hydrogen bonds at the center. Notice that TsTBP1, a single protein chain, is composed of two symmetrical halves, and is easily seen in the pairs of phenylalanine residues and the two asparagines. Fig 2D shows the positive patches located over the conserved positive amino acids involved in DNA recognition (*i.e.*, R<sup>82</sup>, R<sup>89</sup>, K<sup>104</sup>, K<sup>111</sup>, R<sup>180</sup>, K<sup>195</sup>, K<sup>202</sup>) and reveals the solvent access surface. These residues generate a positive charge density over the concave underside isosurface of the saddle, and allow a strong interaction with negatively charged phosphates in the DNA backbone.

## Identification and localization of TBP1 in cysticerci

*Taenia solium* nuclear extract protein integrity was observed in an SDS-PAGE stained with Coomassie blue, showing proteins in a range between 10 to 250 kDa (Fig 3A, lane 1). Western blot assay showed that anti-pTsTBP1-N and anti-pTsTBP1-C antibodies recognized a band of ~26 kDa (native TsTBP1) in *T. solium* nuclear extract, Fig 3B, lanes 2 and 3, respectively. In contrast, no bands were recognized when normal rabbit IgGs were used as negative control (Fig 3B, lane 1). Confocal microscopy with DAPI, anti-pTsTBP1-C and anti-histone H1 antibodies revealed the presence of DNA (blue), TsTBP1 (green), and histone H1 (red) in form of specks in the nucleus of the cells that form the vesicular wall of *T. crassiceps* cysticerci, moreover no signal was observed when normal IgG from mouse or rabbit and second antibodies (anti-mouse IgG-Alexa-568, and anti-rabbit IgG-Alexa-488) were used as controls (Fig 3C). Merging of the image (Fig 3C) and its amplification (Fig 3D) show the co-localization of DNA, TBP1, and histone H1, as yellow specks, and a faint blue signal (DAPI) present where no signal to histone H1 and TBP1 was seen (Merging of Fig 3D). Finally, the faint signal observed in the cytoplasm of some cells could be due to the anti-histone H1 and anti-pTsTBP1-C antibodies that may recognize these molecules during their transport to the nucleus after being translated in the ribosomes. Analysis of the fluorescence on the xyz planes showed that the TBP1 and histone H1 signal are inside the nucleus (S1 Fig), and the quantification of fluorescence shows a 100:79 ratio for histone H1 and TsTBP1, respectively (S2 Fig), not statistical significance was observed.

## TsTBP1 interactions with the TATA-box motif

To establish the interaction of TsTBP1 with the TATA-box motif, we performed EMSA. As DNA targets, we used two putative TATA-box motifs located in the core promoter from two *T.*



**Fig 3. Composition of nuclear extract proteins and immunodetection of native TsTBP1.** A) 10% SDS-PAGE of cysticerci *T. solium* nuclear extract patterns stained with Coomassie blue (lane 1). B) Western blot of TsTBP1 on *T. solium* nuclear extract with: normal serum IgG (lane 1), anti-pTsTBP1-N (lane 2), and anti-pTsTBP1-C antibodies (lane 3). C) Localization of TBP1 on *Taenia crassiceps* cysticerci sections by confocal microscopy with DAPI (blue), anti-histone H1 (green), anti-pTsTBP1-N antibodies (red) and merging of previous images (yellow signal). Negative control for primary and secondary antibodies, were normal mouse IgG plus anti-mouse IgG-Alexa-568 and normal rabbit IgG plus anti-rabbit IgG-Alexa-488. D) Digital amplification of a single nucleus to observe the localization of DNA (blue), histone H1 (green), and TBP1 (red), and their co-localization (yellow signal).

doi:10.1371/journal.pone.0141818.g003

*solium* genes: actin 5 (pAT5) and 2-Cys peroxiredoxin (Ts2-CysPrx), both localized between -30 to -23 bp relative to the TSS. We also used as a control the consensus TATA-box of adenovirus major late promoter (TATA-box consensus, Table 1). The interaction of TsTBP1 with the putative TATA-box of pAT5 (Fig 4) and Ts2-CysPrx (Fig 5) labeled dsDNA probes showed a shifted band produced by TsTBP1 binding to the respective probe (see lanes 2, Figs 4 and 5). In lanes 3, 4, and 5 of Fig 4A a decrease in the intensity of the shifted band can be observed due

**Table 1. Double-stranded DNA probes used for the interaction of TsTBP1 with different TATA-box sequences by EMSA.** In bold letters are represented the putative TATA-box for each gene. Underlined bases are the mutated bases in the TATA-box consensus.

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| pAT5 TATA-box          | 5'–CCCAAATC <b>TTATATAA</b> ACCGTGGGT–3'  |
|                        | 3'–GGGTTTGAATATATTTGGCACCCA–5'            |
| Ts2-CysPRX TATA-box    | 5'–GCGCTTCGCT <b>TATATT</b> GGCGGTAAG–3'  |
|                        | 3'–CGCGAAGCGATATAAACCGCCATTC–5'           |
| Consensus TATA-box     | 5'–AAGGGGGGCT <b>TATAAAG</b> GGGGTGGG–3'  |
|                        | 3'–TTCCCCCGATATTTCCCCACCC–5'              |
| Consensus TATA-box mut | 5'–AAGGGGGGCT <b>TGTGA</b> AAGGGGGTGGG–3' |
|                        | 3'–TTCCCCCGATATTTCCCCACCC–5'              |

doi:10.1371/journal.pone.0141818.t001

to homologous competence with TATA-box of the pAT5. Densitometric analysis shows a decrease of 17%, 72%, and 89% for 25X, 50X and 100X with the non-labeled probe, respectively (Fig 4B). In lanes 3, 4, and 5 of Fig 5A also a decrease in the intensity of shifted band were observed with TATA-box of the Ts2-CysPrx. The densitometric analysis also shows a decrease of 61%, 73% and 87% when 25X, 50X and 100X with cold probe were used, respectively (Fig 5B). In lane 6 of Figs 4 and 5, a super-shifted band is observed due to the interaction with the anti-pTsTBP1-N antibody. In lane 7 of same figures, a shifted band is also observed when the consensus TATA-box labeled probe was added to the reaction. In contrast, in lanes 8, disappearance of the shifted band is observed, when the labeled mutated consensus TATA-box probe was added.

Fig 4A in lanes 9, 10, and 11, shows the competence of the interaction between TsTBP1 and the putative TATA-box of pAT5 and Ts2-CysPrx TATA-box cold probes in a molar excess of 25X, 50X, and 100X, respectively. A strong competition was seen using a 50X molar excess cold probe, where the density of the band decrease to up 36% (Fig 4B). In contrast, Fig 5A, in lanes 9, 10, and 11, shows competence of the interaction between TsTBP1 and the putative TATA-box Ts2-CysPrx with pAT5 TATA-box cold probe; a strong competition is observed starting at the 25X molar excess cold probe, where density of the band decrease to up 24% (Fig 5B). Finally, in lane 12 of Figs 4 and 5, no shifted band is observed when only anti-pTsTBP1-N antibodies were used in the reaction without nuclear extract.

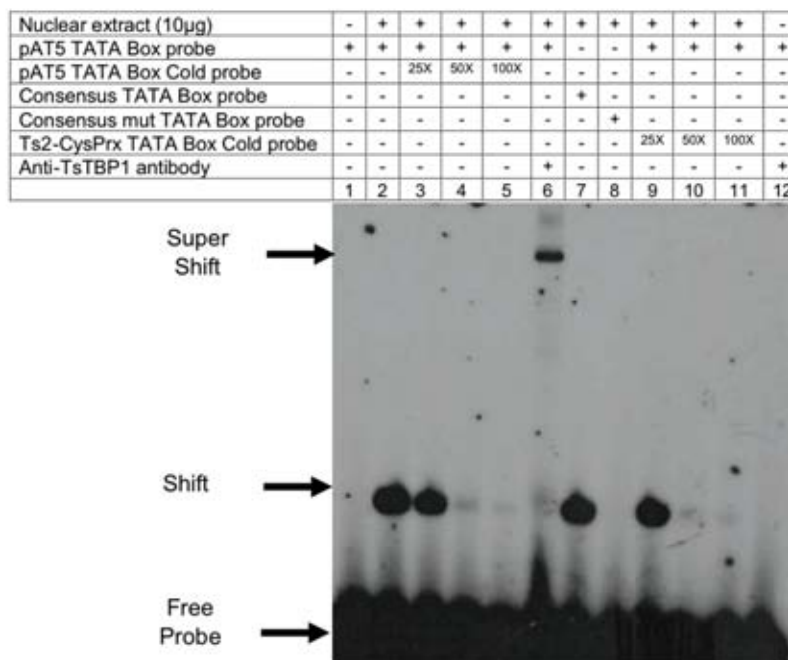
## Inhibition of binding TsTBP1 to TATA-box motif

To see if antibodies were able to inhibit binding of TsTBP1 to TATA-box of pAT5, an EMSA was performed. Fig 6 shows that incubation first of *T. solium* nuclear extract and TATA-box of biotin-labeled pAT5, followed of the incubation with anti-pTsTBP1-C antibodies, normal rabbit IgG and anti-pTsTBP1-N antibodies, reaction produced a supershifted (lane 3), shifted (lane 5), and supershifted (lane 7) bands, respectively. In contrast, the incubation of *T. solium* nuclear extract with anti-pTsTBP1-C antibodies, normal rabbit IgG and anti-pTsTBP1-N antibodies, before the addition of biotin-labeled TATA-box from pAT5, produced no band (lane 4), a shifted (lane 6), and supershifted (lane 8) bands, respectively. Lane 2 shows a shifted band after *T. solium* nuclear extract was incubated with the biotin-labeled TATA-box probe from pAT5, and lane 1 shows no band in the biotin-labeled TATA-box probe from pAT5 in absence of nuclear extract.

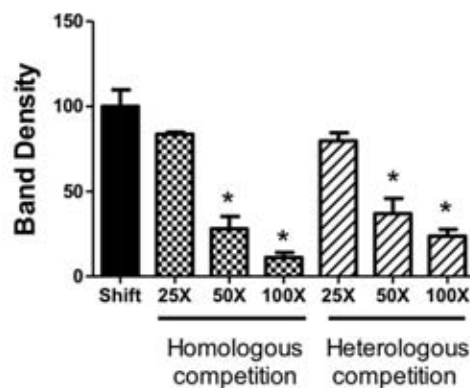
## Discussion

We found two identical cDNA clones of about 900 bp, after screening about 45,000 phages of an adult *T. solium* cDNA library, which means that TBP1 mRNA correspond to 0.0045% of

A



B

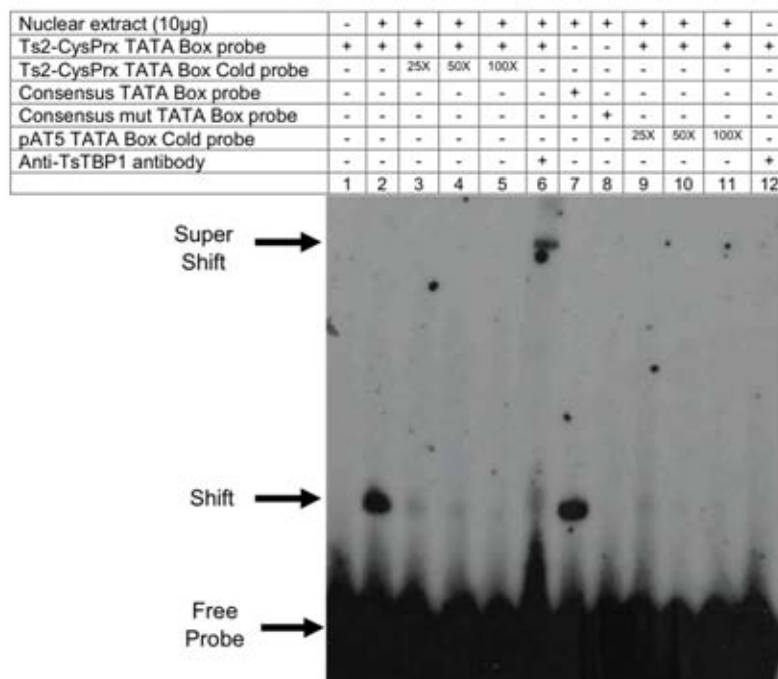


**Fig 4. Electrophoretic mobility shift assay showing the interaction of wild type TsTBP1 pAT5 TATA-box probe.** A) Lane 1: Labeled dsDNA-<sup>32</sup>P probe without nuclear extract; lane 2: TsTBP1-pAT5 TATA-box interaction with *T. solium* nuclear extract; lanes 3, 4, and 5: competence with pAT5 TATA-box cold probe in a molar excess of 25X, 50X, and 100X, respectively; lane 6: super-shift interaction using anti-pTsTBP1-N; lane 7: consensus TATA-box probe interaction with *T. solium* nuclear extract (used as positive control); lane 8: consensus mutated TATA-box probe interaction with nuclear extract (used as negative control); lane 9, 10 and 11: cross-competence with Ts2-CysPrx TATA-box cold probe in a molar excess of 25X, 50X, and 100X, respectively; lane 12: anti-TsTBP1-N antibody without *T. solium* nuclear extract (negative control). Shifted, super-shifted bands and the free-labeled dsDNA probe, are indicated by arrows. B) Densitometric analysis shows a decrease on the intensity of shifted bands in homologous and heterologous competition. Results are present as percentage mean  $\pm$  SD of the shifted band in lane 2 ( $P < 0.005$ ).

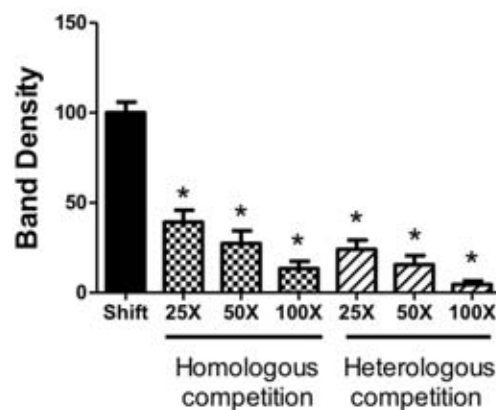
doi:10.1371/journal.pone.0141818.g004

our library, this result is in agreement with reports for *Onchocerca volvulus* and for human liver, where low abundance of mRNA coding for TBP1 has been found, however is enough to

A

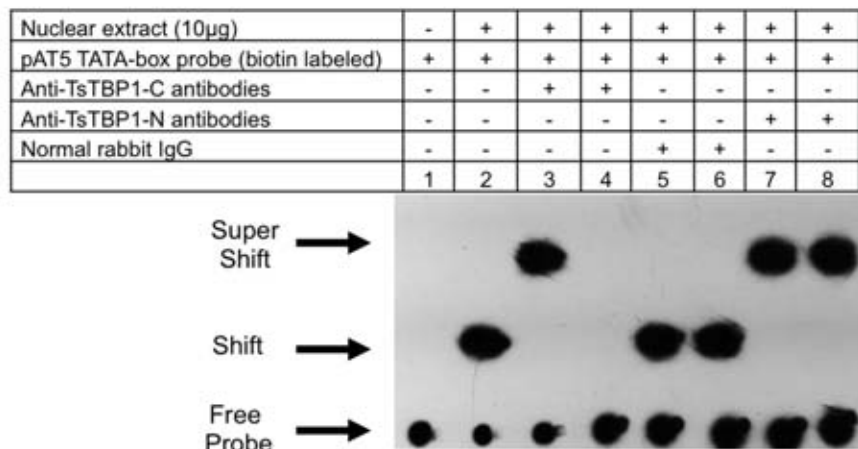


B



**Fig 5. Electrophoretic mobility shift assay showing the interaction of wild type TsTBP1 with Ts2-CysPrx TATA-box probe.** A) Lane 1: Labeled dsDNA-<sup>32</sup>P probe without nuclear extract; lane 2: TsTBP1-Ts2-CysPrx TATA-box interaction with *T. solium* nuclear extract; lanes 3, 4, and 5: competence with Ts2-CysPrx TATA-box cold probe in a molar excess of 25X, 50X, and 100X, respectively; lane 6: super-shift interaction using anti-pTsTBP1-N; lane 7: consensus TATA-box probe interaction with *T. solium* nuclear extract (used as positive control); lane 8: consensus mutated TATA-box probe interaction with nuclear extract (used as negative control); lane 9, 10, and 11: cross-competence with pAT5 TATA-box cold probe in a molar excess of 25X, 50X, and 100X, respectively; lane 12: anti-TsTBP1-N antibody without *T. solium* nuclear extract (negative control). Shifted, super-shifted bands, and the free-labeled dsDNA probe are indicated by arrows. B) The densitometric analysis shows a decrease on the intensity of shifted bands in homologous and heterologous competition. Results are present as percentage mean  $\pm$  SD of the shifted band in lane 2 ( $P < 0.005$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0141818.g005



**Fig 6. EMSA showing the inhibition of the binding of TsTBP1 to TATA-box of pAT5 by the anti-pTsTBP1-C.** Lane 1: labeled TATA-box pAT5 dsDNA-biotin probe without *T. solium* nuclear extract; lane 2: TATA-box pAT5 interaction with *T. solium* nuclear extract; lane 3: TATA-box pAT5 plus *T. solium* nuclear extract and anti-pTsTBP1-C antibodies; lane 4: *T. solium* nuclear extract plus anti-pTsTBP1-C with TATA-box pAT5; lane 5: TATA-box pAT5 plus *T. solium* nuclear extract and normal rabbit IgG, lane 6: *T. solium* nuclear extract plus normal rabbit IgG and TATA box pAT5, lane 7: TATA-box pAT5 plus *T. solium* nuclear extract and anti-pTsTBP1-N antibodies, and lane 8: *T. solium* nuclear extract plus anti-pTsTBP1-N antibodies and TATA-box pAT5.

doi:10.1371/journal.pone.0141818.g006

maintain the PIC formation for the transcription process [37–39]. These findings suggest that the mRNA for TsTBP1 is very stable.

The amino acid deduced sequence from the cDNA phage clones and its comparison analysis with other TBPs revealed coding for TBP1 with a predicted molecular weight of 26.7 kDa, which can be divided into an NH<sub>2</sub>-ter and a COOH-ter. The COOH-ter is composed of 190 residues, which resulted to be highly conserved among species; moreover, it contains all amino acids involved in DNA interactions and some GTFs. The constructed homology model for TsTBP1 showed that the COOH-ter forms the classical ribbon structure composed of ~180 residues, and an extra  $\alpha$ -helix at the end of the domain, which is composed by the amino acids SDKSGLHQPALTG. Noteworthy, the extra  $\alpha$ -helix is also conserved in *E. multilocularis* and *E. granulosus*, but its function is unknown. The superposition of TsTBP1 structure with X-ray structures of human and yeast TBPs shows that the recognizing motifs for DNA and GTFs (TFIIA and TFIIB) are structurally conserved in this domain. On the other hand, the model for the COOH-ter of TBP1 shows that all amino acids that interact with TATA-box are conserved and in the concave region of this domain; likewise, it shows that the amino acids that form positive patches interact with the phosphate groups and form hydrogen bonds that stabilize the TBP1-TATA-box structure. These findings indicate the relevance that the COOH-ter of TsTBP1 has in the binding of DNA and GTFs for PIC formation in the transcription process.

In contrast, the NH<sub>2</sub>-ter of TBP1 is composed of 48 residues and presents a high homology in length, amino acid composition, and structure with the TBP1 from *E. multilocularis* and *E. granulosus*, but only 31% identity with HsTBP1 and SsTBP1 (*T. solium* hosts). The constructed homology model for TsTBP1 showed that NH<sub>2</sub>-ter is composed of three helices connected by random coils. The NH<sub>2</sub>-ter domain is key for species-specific transcription factors binding and acts as a negative regulator of TBP1 function [6, 10].

Western blot assays with the anti-pTsTBP1-N and anti-pTsTBP1-C antibodies, led us to the identification of the native TsTBP1 as a 26 kDa-band in *T. solium* nuclear extract, this result is in agreement with the predicted molecular weight from the translated cDNA sequence of the TsTBP1 clone. The same antibodies together with anti-histone H1 antibodies and DAPI by confocal microscopy showed that TBP1 is localized in the nucleoplasm of cells of *T. crassiceps* cysticerci. Noteworthy, the nucleolus was observed as a dark zone with a slightly blue signal produced by DAPI, no signal was produced in this region by anti-pTsTBP1-C and anti-histone H1 antibodies, despite that histone H1 and TBP1 are components of the nucleolus. A possible explanation for this observation is the high-density produced by the rRNA transcribed in the nucleolus that does not permit the entrance of antibodies, as has been mentioned previously [40].

EMSA showed binding of TATA-box probes (adenovirus major late promoter, Ts2-CysPrx, and pAT5) to TsTBP1. This observation was further confirmed by a super-shift assay using anti-pTsTBP1-N antibodies. On the other hand, cross competition assays showed that TsTBP1 has a higher affinity for the TATA-box of pAT5 promoter than the TATA-box of Ts2-CysPrx promoter. These findings suggest that the TATA-box of the pAT5 promoter has a more stable interaction with TsTBP1 and a better formation of the PIC than the TATA-box of the Ts2-CysPrx promoter. Noteworthy, EMSA also demonstrated that anti-pTsTBP1-C antibodies recognize epitopes on the extra  $\alpha$ -helix localized at the end of the COOH-ter of TsTBP1. These antibodies were able to inhibit the binding of TsTBP1 to the TATA-box of the pAT5 promoter; on the contrary, neither normal IgG or anti-pTsTBP1-N antibodies can inhibit this binding, which suggests that the transcription process can be disrupted in this parasite. However, more specific studies should be done to know if this inhibition is species specific.

*Echinococcus granulosus* and *T. solium* are parasites causing hydatidosis and neurocysticercosis in humans, diseases posing economic and health problems, and as long as governments fail to offer education and sanitary health infrastructure in developed countries, these parasites will persist [41–43]. For *T. solium* diseases control, there are only two drugs approved by the WHO, praziquantel, and albendazole. These drugs killing just 65% of parasites and obtaining complete cure in less than 40% of patients with neurocysticercosis [44], additionally the use of these drugs could be dangerous in patients with heavy cyst burdens, or when post-treatment inflammation causes intracranial hypertension or hydrocephalus [45]. On the other hand, *T. solium* has started to develop resistance against albendazole [46, 47]. For this reason is necessary more research about the design of new safe and efficacy drugs.

TBP is essential for the development of the organism and its lack leads to death [48]. Therefore, the differences found in the NH<sub>2</sub>- and COOH-ter between TBP1s of *Taeniidae* family and its mammalian hosts, could be used as a potential target to develop new molecules to inhibit transcription in these parasites. Monoclonal, recombinant antibodies or peptides against transcription factors could be an option, because it is known that polyclonal and monoclonal antibodies against non-conserved regions inhibit in ~74% the catalytic activity of *T. solium* triosephosphate isomerase (TPI), and monoclonal against to *S. mansoni* TPI by passive immunization assays confer partial protection (41–49%) against schistosomiasis in mice [49–51]. Finally, to our knowledge, this is the first study demonstrating that TBP is involved in gene transcription of cestodes.

## Supporting Information

**S1 Fig. Confocal microscopy xyz planes showing fluorescence inside the nucleus.** A) DAPI + TsTBP1, B) DAPI + histone H1 and C) DAPI + TsTBP1 + histone H1. (TIF)

**S2 Fig. Confocal microscopy fluorescence quantification.** A) Schematic representation of the fluorescence quantification and the plane used for the analysis. B) Relative abundance of histone H1 (100%) and TsTBP1 (79%), not statistical significance was observed. (TIF)

## Acknowledgments

This work was done by ORL in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree from *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (PMYDCB) of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ORL LJ AZH AL. Performed the experiments: ORL PGG LJ RL. Analyzed the data: ORL PGG LJ AZH AL. Contributed reagents/materials/analysis tools: PGG AZH RL AL. Wrote the paper: ORL PGG LJ AL.

## References

1. Juven-Gershon T, Hsu JY, Kadonaga JT. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(6): 1047–1050.
2. Chalkley G, Verrijzer P. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF<sub>II</sub>250-TAF<sub>II</sub>150 complex recognizes the initiator. *EMBO J* 1999; 18(17): 4835–4845.
3. Juo Z, Chiu T, Lieberman P, Baikov I, Berk A, Dickerson R. How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol* 1996; 261: 239–254.
4. Cormack BP., Struhl K. The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* 1992; 69:685–696.
5. Rigby PWJ. Three in one and one in three: it all depends on TBP. *Cell* 1993; 72: 7–10.
6. Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 1993; 7: 1291–1308.
7. Sikorski TW, Buratowski S. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21: 344–351.
8. Kim J, Burley S. 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. *Structural Biol* 1994; 1(9): 638–653.
9. Orphanide G, Reinberg D. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell* 2002; 108, 439–451.
10. Lescure A, Lutz Y, Eberhard D, Jacq X, Krol A, Grummt I, et al. The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J*. 1994; 13(5):1166–75.
11. Nikolov D, Hu SH, Lin J, Gasch A, Hoffmann A, Horikoshi M, et al. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 1992; 360, 40–46.
12. Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gomez E, Hernandez R, et al. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1990; 40, 87–93.
13. Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R, Landa A. Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 2009; 105(3): 781–787.
14. Parra-Unda R, Vaca-Paniagua F, Jiménez L, Landa A. Cu,Zn superoxide dismutase: Cloning and analysis of the *Taenia solium* gene and *Taenia crassiceps* cDNA. *Exp Parasitol* 2012; 130(1): 32–38.
15. Jiménez L, Rodríguez-Lima O, Ochoa-Sánchez A, Landa A. Characterization of a Thioredoxin-1 gene from *Taenia solium* and its encoding product. *Bio Med Research Int*. Article ID 453469, 2015. doi: [10.1155/2015/453469](https://doi.org/10.1155/2015/453469)
16. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genome of four tapeworm species reveal adaptation to parasitism. *Nature* 2013; 496(7443):57–63.
17. Almeida CR, Stoco PH, Wagner G, Sincero TCM, Rotava G, Bayer-Santos E, et al. Transcriptome analysis of *Taenia solium* cysticerci using Open Reading Frame ESTs (ORESTES). *Parasit Vectors* 2009; 2(1): 35.
18. Wu X, Fu Y, Yang D, Zhang R, Zheng W, Nie W, et al. Detailed Transcriptome Description of the Neglected Cestode *Taenia multiceps*. *PLoS ONE* 2012; 7(9):e45830

19. Yang D, Fu Y, Xie Y, Nie H, Chen L, Nong X, et al. Annotation of the Transcriptome from *Taenia pisiformis* and its Comparative Analysis with Three Taeniidae Species. PLoS ONE 2012; 7(4):e32283.
20. Aguilar-Díaz H, Bobes RJ, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos MA, et al. The genome Project of *Taenia solium*. Parasit Int 2006; 55: S127–S130.
21. Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda Taeniidae) in BALB/cJ mice. J Parasitol 2004; 90: 79–84.
22. Molina-López J, Jiménez L, Ochoa-Sánchez A, Landa A. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys Peroxiredoxin from *Taenia solium*. J Parasitol 2006; 92(4): 796–802.
23. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10037–10041.
24. Reyes-Juárez JL, Juárez-Rubí R, Rodríguez G, Zarain-Herzberg A. Transcriptional analysis of the human cardiac caldesmon gene in cardiac and skeletal myocytes. J Biol Chem 2007; 282: 35554–35563.
25. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 2012; 9: 671–675.
26. Beaudoin E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM, Gautheret D. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. Genome Res 2000; 10(7):1001–1010.
27. Kim Y, Geiger JH, Hahn S, Sigler PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. Nature 1993; 365, 512–520.
28. Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. Genes Dev 1999; 13(24):3217–30.
29. Tan S, Hunziker Y, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of a yeast TFIIB/TBP/DNA complex. Nature 1996; 381(6578):127–51.
30. Burley SK. X-ray crystallographic studies of eukaryotic transcription initiation factors. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1996; 351(1339):483–9.
31. Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(24):13668–73.
32. Kamada K, Shu F, Chen H, Malik S, Stelzer G, Roeder RG, et al. Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. Cell 1999; 106(1):71–81.
33. Cang Y, Prelich G. Direct stimulation of transcription by negative cofactor 2 (NC2) through TATA-binding protein (TBP). Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(20): 12727–32.
34. Gilfillan S, Stelzer G, Piaia E, Hofmann MG, Meisterernst M. Efficient binding of NC2. TATA-binding protein to DNA in the absence of TATA. J Biol Chem 2005; 280(7):6222–30.
35. Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohyama Y, Siponen MI, Lundström P, et al. High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. Nat Struct Mol Biol 2013; 20(8):1008–1015.
36. Chasman DI, Flaherty KM, Sharp PA, Kornberg RD. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 8174–8178.
37. Choy B, Green MR. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. Nature 1993; 366: 531–536.
38. Li S, Donelson JE. The gene for the TATA box-binding protein of *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol 1993; 61: 321–324.
39. Schmidt E.E., Schibler U. High accumulation of components of the RNA polymerase II transcription machinery in rodent spermatids. Development 1995; 121: 2373–2383.
40. Masson C., Bouniol C., Fomproix N., Szöllösi M.S., Debey P., Hernandez-Verdun D. Conditions favoring RNA Polymerase I Transcription in permeabilized cells. Exp Cell Res 1996; 226: 114–125.
41. Correa M, Flisser-Steinbruch A, Sarti-Gutiérrez E. Teniasis y cisticercosis. In: Valdespino-Gómez J, I Río-Zolezzi De A, Velasco-Castrejon D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, ed. Enfermedades Tropicales en México. México, D.F.: Secretaría de Salud 1994; 8:335–345.
42. Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becceiril Rodríguez P, Larralde C, et al. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(8): e805. doi: [10.1371/journal.pntd.0000805](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000805)
43. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Morales-Montor J, Hernández-Bello R and Larralde C. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to focus on the challenge. J Biomed Biotech 2011; doi: [10.1155/2011/516042](https://doi.org/10.1155/2011/516042)

44. Sotelo J, del Brutto OH, Penagos P, et al. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 1990; 237: 69–72.
45. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. Cysticercosis of the central nervous system: how should it be managed? *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24:423–427.
46. Chong MS, Hawkins CP, Cook GC, Hawkes CH, Kocen RS. A resistant case of neurocystercosis. *Postgraduate Medical Journal*, vol. 67 pp. 577–8, 1991.
47. Hasan MS, Basri HB, Hin LP, Stanslas J. Surgical remotion of a cysticercotic granuloma responsible for refractory seizures: A case report. *Surg Neurol Int* 2011; 2: 177. doi: [10.4103/2152-7806.90698](https://doi.org/10.4103/2152-7806.90698)
48. Reichelen MJ, Murakami KS, Ferry JG. Functional analysis of three TATA binding protein homologs in *Methanosarcina acetovirans*. *J Bacteriol* 2010; 192(6): 1511–1517.
49. Sanabria-Ayala V1, Belmont I, Abraham L. Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPI): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity. *Parasitol Res* 2015; 114: 55–64.
50. Sanabria-Ayala V, Medina-Flores Y, Zavala-Carballo A, Jiménez L, Landa A. Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*. *Exp Parasitol* 2013; 134: 495–503.
51. Harn D.A, Gu W, Oligino LD., Mitsuyama M, Gebremichael A, Richter D.. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J Immunol* 1992; 148: 562–567.

## Research Article

# Characterization of a Thioredoxin-1 Gene from *Taenia solium* and Its Encoding Product

Lucía Jiménez, Oscar Rodríguez-Lima, Alicia Ochoa-Sánchez, and Abraham Landa

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Edificio A, No. 2 Piso, 04510 Mexico, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Abraham Landa; landap@unam.mx

Received 15 August 2014; Accepted 14 October 2014

Academic Editor: Luis I. Terrazas

Copyright © Lucía Jiménez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Taenia solium* thioredoxin-1 gene (*TsTrx-1*) has a length of 771 bp with three exons and two introns. The core promoter gene presents two putative stress transcription factor binding sites, one putative TATA box, and a transcription start site (TSS). *TsTrx-1* mRNA is expressed higher in larvae than in adult. This gene encodes a protein of 107 amino acids that presents the Trx active site (CGPC), the classical secondary structure of the thioredoxin fold, and the highest degree of identity with the *Echinococcus granulosus* Trx. A recombinant *TsTrx-1* (r*TsTrx-1*) was produced in *Escherichia coli* with redox activity. Optimal activity for r*TsTrx-1* was at pH 6.5 in the range of 15 to 25°C. The enzyme conserved activity for 3 h and lost it in 24 h at 37°C. r*TsTrx-1* lost 50% activity after 1 h and lost activity completely in 24 h at temperatures higher than 55°C. Best storage temperature for r*TsTrx-1* was at -70°C. It was inhibited by high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and methylglyoxal (MG), but it was inhibited neither by NaCl nor by anti-r*TsTrx-1* rabbit antibodies that strongly recognized a ~12 kDa band in extracts from several parasites. These *TsTrx-1* properties open the opportunity to study its role in relationship *T. solium*-hosts.

## 1. Introduction

Thioredoxin (Trx) is a small (~12 kDa) enzyme that belongs to the reductase family. Trx reduces disulfides in several proteins using its conserved dithiol active site. It is ubiquitous and multifunctional; it is involved in processes such as maintenance of cellular homeostasis, cell proliferation, detoxification of peroxides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydroperoxides), DNA synthesis, signaling, and inhibition of apoptosis. Likewise it reduces diverse molecules of low molecular weights, such as glutathione disulfide, as well antioxidants dehydroascorbate, lipoic acid, and lipoamine [1–4]. All these events oxidize Trx, and it is reduced by thioredoxin glutathione reductase (TGR) and NADPH + H<sup>+</sup>; these components form the thioredoxin system in platyhelminths [5].

Trx has been classified into cytosolic (Trx-1) and mitochondrial (Trx-2); the latter is synthesized with an additional N-terminal extension that targets the mitochondrial protein, where it is cleaved to yield the ~12 kDa form [3]. All Trx enzymes have a similar structure, the Trx fold that is formed by a central domain with five-stranded  $\beta$ -sheet, surrounded

by four  $\alpha$ -helices, and the active site (CGPC), located between  $\beta$  strand 2 and  $\alpha$ -helix 2 [3].

In Cestoda, Trx and TGR have been reported in *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*. On the other hand, these organisms and *Taenia solium* possess a typical 2-Cys peroxiredoxin, which reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hydroperoxides to water and its corresponding alcohol using the thioredoxin system. This shows that these organisms are able to regulate hydroperoxides levels and repair enzymes inactivated by oxidative stress [5–9].

Neurocysticercosis is the most common parasitic brain disease worldwide; moreover the high relationship between epilepsy and neurocysticercosis is considered now as a “biological marker” of the social and economic development of a community [10]. No commercial vaccine exists to prevent this parasitic disease and the treatment relies on two drugs, albendazole and praziquantel, to which *T. solium* has started to develop resistance [11, 12]. Therefore, the identification and biochemical characterization of new targets are important tools for development of vaccines or therapeutic drugs.

In this study, we describe the cloning and characterization of a gene that encodes a thioredoxin-1 from *Taenia solium* (*TsTrx-1*) and present a partial biochemical characterization of its encoding product.

## 2. Material and Methods

**2.1. *Taenia solium* Trx Gene and cDNA Isolation.** A Trx probe was generated by RT-PCR using the SuperScript One Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 1 µg of *T. solium* larval total RNA prepared by TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and two degenerated primers called TRX-1 and TRX-2 designed from the well conserved regions (TWCGPCK and MPTLFVFK) in Trx enzymes. The RT-PCR program for cDNA synthesis was 1 cycle at 50°C for 30 min, 30 cycles at 94°C for 1 min, 54°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, and a final extension cycle at 72°C for 15 min. The fragment (probe) obtained was cloned into pCRII vector (Invitrogen), sequenced on an automated DNA sequencer ABI Prism model 373 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem, Foster City, CA), and the nucleotide translation to amino acids sequence was analyzed with the PCGENE program. Screenings for *T. solium* cysticerci cDNA and genomic DNA libraries were carried out using 45,000 and 120,000 λZAPII phages, respectively. Both libraries were hybridized with the aforementioned probe, as previously described [8, 9]. Phage positive clones obtained after three screening rounds of each library were converted to Bluescript plasmids using ExAssist helper phage (Stratagene, La Jolla, CA). Plasmids were sequenced and analyzed as before. Intron detection was carried out with the PCGENE and analyses of amino acid sequences were performed through BLAST (National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). Alignment of the multiple amino acid sequences was performed by Clustal X (<http://www.clustal.org/>). The proximal promoter analysis for detecting putative transcription binding sites was carried out with the TRANSFAC program (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>).

**2.2. Transcription Start Site Determination.** *Taenia solium* larval total RNA (200 ng) was used as template for the transcription start site (TSS) determination using the Smart RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Mountain View, CA). RACE fragments were amplified by PCR using reverse primer TRXRE-1 designed from the region DEMAKENAN (5'-GTTAGCATTCTCCTTTGCCATTTCGTC-3') and forward primer SMARTII from kit (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') following manufacturer's directions. The resulting bands were cloned into pCRII (Invitrogen), sequenced, and compared with the results obtained with the neural network analysis tool (<http://www.fruitfly.org/>) to confirm transcription start site (TSS) found by the 5'-RACE method.

**2.3. Transcripts Relative Expression.** For the real time-PCR, 3 µg of total RNA from *T. solium* larval and adult stages was reverse-transcribed to cDNA using SMARTScribe Reverse Transcriptase and 5'-CDS primer A (Clontech) according

to manufacturer's instructions. cDNA 200 ng was used for each reaction in a volume of 10 µL using the primers TRX-X1 and TRX-X2 designed from the regions (MSVEAVV) and (IQANV-) of *TsTrx-1*. Primers SOZ-2 and SOZ-6 were designed on the regions (KHGFHVH) and (GNAGGR-) of *T. solium* Cu/Zn superoxide dismutase (*TsCu/ZnSOD*) [13]. The reactions were performed with LightCycler 480 SYBR Green I Master in the LightCycler 480 System (Roche, Germany). The real time-PCR program used was 95°C for 10 min and then 40 cycles at 95°C for 15 sec and 52°C for 1 min and 72°C for 30 sec. The mRNA levels of *TsTrx-1* were normalized using the *TsCu/ZnSOD* as a housekeeping gene, and relative amounts of mRNA were calculated using the comparative CT method.

**2.4. Purification of Recombinant *TsTrx* (r*TsTrx-1*).** Plasmid pRSET containing the cDNA coding region from *TsTrx-1* was expressed on BL21(DE3) bacteria with 1 mM IPTG during 4 h. Bacteria were centrifuged at 10,000 ×g and the pellet was disrupted by sonication in a TrisED buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT, pH 7.5) plus 4 M urea. The supernatant was applied onto a Ni+ sepharose column (His Trap HP GE Healthcare) and eluted with TrisED plus urea using a linear gradient of imidazole (0, 50, 100, 200, 300, and 400 mM). Fractions containing high Trx activity were dialyzed in TrisED buffer and reloaded in the Ni+ sepharose column for a second purification process without urea. The Trx obtained was concentrated and proteins concentration was determined by the Lowry method. Purification process of r*TsTrx-1* was visualized by 15% SDS-PAGE staining with Coomassie Brilliant Blue.

**2.5. Production of Antibodies and Western Blot.** A 10-week-old New Zealand rabbit was immunized subcutaneously with 100 µg of the purified recombinant enzyme plus 10 µg of saponin as adjuvant. Immunizations were conducted on days 1, 15, and 30. Antisera were obtained one week after the third immunization.

For western blot analysis, 1 µg/mm of r*TsTrx-1*, rTrx-*E. coli*, and human T-cell recombinant Trx (rTrx-human, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and likewise 5 µg/mm of parasites crude extract and *T. solium* cysticerci excretion-secretion antigens (E/S Ag), prepared as described in [14], were separated by 15% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Sweden). The membrane was blocked with 1% BSA in PBS containing 0.05% Tween 20 buffer and incubated for 2 h at room temperature with the anti-r*TsTrx-1* serum (dilution 1:100). After 3 washes of 5 min with PBS containing 0.05% Tween, the membrane was incubated for 1 h with horseradish peroxidase- (HRP-) conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000). Bands recognized by the anti-r*TsTrx-1* serum were visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate; normal rabbit serum was used as negative control at the same dilution.

**2.6. Effect of pH, Temperature, Methylglyoxal (MG), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl, and Anti-*TsTrx-1* Antibodies on r*TsTrx-1* Activity.** The oxidoreductase activity of r*TsTrx-1* was determined by the

|      |                                                                                             |     |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| gDNA | ATCACGTGCACAATTTGGAACTGCGGTGTAATAAATAAATAATTAACAATGCTTTAATGACCTTGAAGGCTGTTAACAGAGCTCCTTGT   | 42  |
| gDNA | AGCACGTTTCAAAGAGTTACGCCATTTCAGTTTCTGAGAAATGTCGGTGGAGGTGGTTGTTAAGACGGTGGATGGTGACGTACGTGGCTGA | 132 |
| cDNA | CAAAGAGTTACGCCATTTCAGTTTCTGAGAAATGTCGGTGGAGGTGGTTGTTAAGACGGTGGATGGTGAC                      | 69  |
| Prot | M S V E A V V K T V D G D                                                                   | 13  |
| gDNA | TTCGTTTGGTGCTTATGACAGACTTTCAATTTACTATCATTATTTATTGTTACTTTTTGTACCTCCTGGTTTCCAGTGGTCGATTTTCAT  | 222 |
| gDNA | TAATACACATTTTTTACATTGGAACACCCGTAAATCTACTTGTTTAAAGAACTCCTTTGTCGACAAATGTGCACCTTAGTGAACCGTTT   | 312 |
| gDNA | TCCTATTTTCTGCTTCGCTCTCTTCAGGCTCTTGAGGCAGCTATTAAGGGAGACAAGCTCCTCGTTTGTGATTTCTTTGCAACTTGGTGCG | 402 |
| cDNA | GGTCTTGAGGCAGCTATTAAGGGAGACAAGCTCCTCGTTTGTGATTTCTTTGCAACTTGGTGCG                            | 133 |
| Prot | G L E A A I K G D K L L V C D F F A T W C                                                   | 34  |
| gDNA | GTCCTGTAAAGCGCTTGTCTCCAAATAGACGAAATGGCAAAGGAGAATGCTAACGTCGCTTTGTAAAGGTCGACGTCGATGAGTGTC     | 492 |
| cDNA | GTCCTGTAAAGCGCTTGTCTCCAAATAGACGAAATGGCAAAGGAGAATGCTAACGTCGCTTTGTAAAGGTCGACGTCGATGAGTGTC     | 223 |
| Prot | G P C K A L A P K L D E M A K E N A N V F V K V D V D E C                                   | 64  |
| gDNA | AGGTATGGTTGTTTTTGTACTATTTTTGTTCTATTTCGGTACGTTCAACCAATACCTTCAATTATAGATGTGCGCCGAGAAGTACCGAGT  | 582 |
| cDNA | AGGTATGGTTGTTTTTGTACTATTTTTGTTCTATTTCGGTACGTTCAACCAATACCTTCAATTATAGATGTGCGCCGAGAAGTACCGAGT  | 248 |
| Prot | Q D V A E K Y R V                                                                           | 73  |
| gDNA | TACCGCCATGCCTACTTTTGGTTGTGTTCAGAACGGGAATGAAATCGGTGCTGTCGTCGGAGCCAATGAGGCTAGCATTAGGGAACCTTAT | 672 |
| cDNA | TACCGCCATGCCTACTTTTGGTTGTGTTCAGAACGGGAATGAAATCGGTGCTGTCGTCGGAGCCAATGAGGCTAGCATTAGGGAACCTTAT | 338 |
| Prot | T A M P T L F V F K N G N E I G R V V G A N E A S I R E L I                                 | 103 |
| gDNA | CCAAGCAAACGCTGAGTCATATATTTAAGAACTATTTCAAAATAAAATCTTAT                                       | 726 |
| cDNA | CCAAGCAAACGCTGAGTCATATATTTAAGAACTATTTCAAAATAAAATCTTATCGTGCTCTTGTCTAAAAA                     | 427 |
| Prot | Q A N V - *****                                                                             | 107 |

FIGURE 1: Genomic (gDNA) and complementary DNA (cDNA) nucleotides sequences and deduced protein from *Taenia solium* thioredoxin-1. Putative transcription factors sites (Nrf2, TBP, and XBP-1) are placed inside a box; DPE is in a white letter inside the grey box; TSS inside the Inr is underlined and signaled by an arrow. Start (ATG) and stop (TGA) codons are inside the box; donor (GT) and acceptor (AG) introns sequences are underlined. Putative branch point is underlined by a black bar; putative U1 and U2AF splicing binding sites are in grey inside a box; polyadenylation sites are indicated by asterisks (\*). Thioredoxin residues from the active site (CGPC) are highlighted in white on a black background.

dithiothreitol (DTT)/insulin reduction method described by Holmgren [15]. Briefly thioredoxin reactions are coupled to DTT using insulin as the protein substrate. rTsTrx-1 or rTrx-*E. coli* at 1, 10, and 20  $\mu$ g were added to 160  $\mu$ M of insulin in PE buffer (100 mM potassium phosphate, pH 6.5, containing 2 mM EDTA and 1 mM DTT). Insulin reduction was monitored by measuring turbidity at 650 nm for 30 min in a spectrophotometer Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences). A sample without rTsTrx-1 was used as reference control.

Assays to determine the pH enzymatic stability were carried out with rTsTrx-1 dialyzed for 8 h in citrate buffer at pH of 3, 5, and 6, in PE buffer at pH of 6.5, 7.5, and in Tris buffer at pH of 8, 9, and 10. The thermal stability of the enzyme was assayed incubating rTsTrx-1 at temperatures between 15 and 100°C during 1, 3, and 24 h. In both assays the Trx residual activity was measured. In addition, the optimal storage temperature was analyzed by incubating the enzyme at temperatures ranging from 25° to -70°C during 1 to 28 days.

To determine whether concentrations of 0 to 8 mM of MG, 0 to 2 M of NaCl, 0 to 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 1, 10, and 20  $\mu$ g of IgG fraction, coming from sera of rabbit immunized with rTsTrx-1 and normal rabbit serum (control), affected the TsTrx-1 activity, the enzyme was incubated in each one for

30 min at 37°C and the activity was measured as before. For all these assays 20  $\mu$ g of enzyme was used.

### 3. Results

**3.1. Isolation of cDNA and Gene Encoding TsTrx-1 and Its Characterization.** Through RT-PCR, using total RNA from larval *T. solium* and primers designed on two conserved regions from several Trxs, we obtained a ~153 bp DNA fragment that evidenced high homology with *Trx* genes. This was used as probe to isolate the transcript and the coding *TsTrx-1* gene by screening a genomic DNA and cDNA  $\lambda$ ZAPII libraries, respectively. Figure 1 shows the isolate genomic DNA sequence; it spans 771 bp and codes for the same Trx-1 as the cDNA. The 5'-RACE experiments on the proximal promoter of the *TsTrx-1* gene showed that the transcription start site (TSS) corresponds to an adenine (A) located within the initiator (Inr, ACAATGC) sequence and mapped at 81 bp upstream of the translation start codon (ATG). Moreover, we identified a putative TATA box located at -19 pb and a GGCTGT motif (downstream promoter element, DPE) at +22 pb, both from the TSS. Additionally, putative binding sites for Nrf2 and XBP1 transcription factors were found at -32 bp and +14 bp, respectively (GenBank accession for *TsTrx-1* gene is KM401604).

TABLE 1: Comparison of the structural coding regions of *Taenia solium* *Trx-1* gene (*TsTrx-1*) with other *Trx-1* genes from *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Schistosoma mansoni*, and *Echinococcus granulosus*.

| Organism                       | Size of structural coding region of gene (kbp) | Number of introns, size (kbp), and position                                                                                                            | Number and size of exons (bp)              | Size encoding product (amino acids) |
|--------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Taenia solium</i>           | 0.605                                          | I: 0.218 (DGD <sup>13-14</sup> GLE)<br>II: 0.065 (ECQ <sup>65-66</sup> DVA)                                                                            | 1: 39<br>2: 156<br>3: 129                  | 107                                 |
| <i>Echinococcus granulosus</i> | 0.609                                          | I: 0.220 (DGD <sup>13-14</sup> ALE)<br>II: 0.065 (ECQ <sup>65-66</sup> DVA)                                                                            | 1: 39<br>2: 156<br>3: 129                  | 107                                 |
| <i>Schistosoma mansoni</i>     | 0.685                                          | I: 0.237 (KQD <sup>10-11</sup> GDL)<br>II: 0.126 (KLE <sup>64-65</sup> ETA)                                                                            | 1: 30<br>2: 162<br>3: 129                  | 106                                 |
| <i>Mus musculus</i>            | ~13                                            | I: 4.2 (ESK <sup>8-9</sup> EAF)<br>II: 0.897 (FFH <sup>43-44</sup> SLC)<br>III: 5.6 (DCQ <sup>63-64</sup> DVA)<br>IV: 1.1 (GQK <sup>85-86</sup> VGE)   | 1: 24<br>2: 105<br>3: 60<br>4: 66<br>5: 63 | 105                                 |
| <i>Homo sapiens</i>            | ~17                                            | I: 5.0 (ESK <sup>8-9</sup> TAF)<br>II: 0.478 (FFH <sup>43-44</sup> SLS)<br>III: 5.9 (DCQ <sup>63-64</sup> DVA)<br>IV: 0.558 (GQK <sup>85-86</sup> VGE) | 1: 24<br>2: 105<br>3: 60<br>4: 66<br>5: 63 | 105                                 |

The structural coding region for the *TsTrx-1* gene spans over 770 pb. It has three exons split by two introns (intron I: 218 bp length; intron II: 65 bp length) that possess the donor-acceptor sites (NGT-AGN). Moreover, the putative binding sites for the splicing machinery U1 (intron I: <sup>121</sup>GTACGT<sup>126</sup>; intron II: <sup>495</sup>GTATGG<sup>500</sup>) and U2AF (intron I: <sup>326</sup>TTCGTCTCTCAG<sup>338</sup>; intron II: <sup>547</sup>CCTTCAATTATAG<sup>459</sup>) were identified. Additionally, the putative branching point in each intron (intron I: <sup>281</sup>TGTCGAC<sup>287</sup>; intron II: <sup>522</sup>TTTCTAT<sup>528</sup>) was identified too. Figure 1 also shows the isolated cDNA with 427 bp with an open reading frame (ORF) from 31 (ATG) to 354 (TGA) bp that encodes for a protein with 107 amino acids with a theoretical molecular weight of 11,579 Da and pI of 4.39. It presents the motif (CGPC) that corresponds to the catalytic active site of Trx enzymes. Furthermore, a putative classic polyadenylation (AATAAA) site was located between 380 and 385 bp downstream of the stop codon (GenBank accession for *TsTrx-1* cDNA is KM401605).

Table 1 depicts a comparison of the coding structural region of the *TsTrx-1* gene with *Trx-1* genes from *E. granulosus*, *Schistosoma mansoni*, human, and mouse [16–19]. It shows that the *Trx-1* genes of *T. solium*, *E. granulosus*, and *S. mansoni* have a similar size, in contrast to mammalian *Trx-1* genes that are bigger. It also depicts that *T. solium* and *E. granulosus* present an identical structural coding region to that of the *Trx-1* gene composed by three exons and two introns. Similarly, *S. mansoni* *Trx-1* gene also presents three exons and two introns, which are slightly larger than *T. solium* and *E. granulosus* *Trx-1* genes. In contrast, human and mouse genes present 5 exons and 4 introns with similar sizes between them, but introns are larger than those of cestodes. It is noteworthy that the second introns of

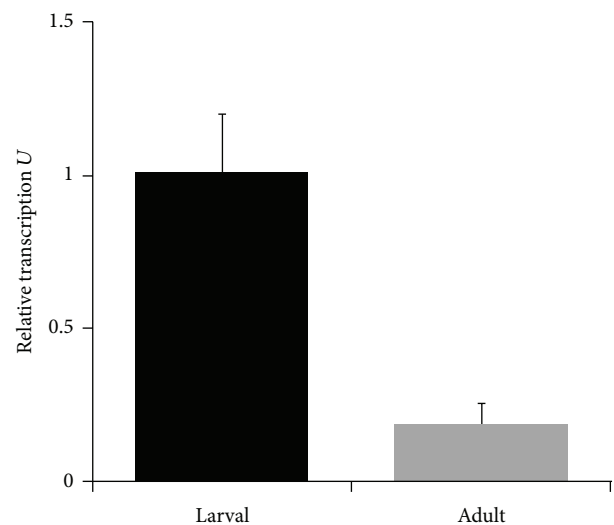


FIGURE 2: Relative transcription of *T. solium* thioredoxin-1 (*TsTrx-1*) gene from larvae and adult stages of *T. solium* was done by real time-PCR using TRX-X1 and TRX-X2 primers.

*TsTrx-1* and *E. granulosus* genes coincide with the second intron of *S. mansoni* and third intron of human and mouse *Trx-1* genes. Figure 2 shows that *TsTrx-1* mRNA was expressed higher in larvae than in adult, as determined by real time-PCR assays.

The comparison of the deduced amino acid sequence of *TsTrx-1* with *E. granulosus* Trx revealed (Figure 3(a)) an 87.85% identity, followed by a 46.72% with *S. mansoni*. In contrast, a low identity, between 41.12 and 43.92%, was found with pig and human Trx-1, respectively. *TsTrx-1* has the

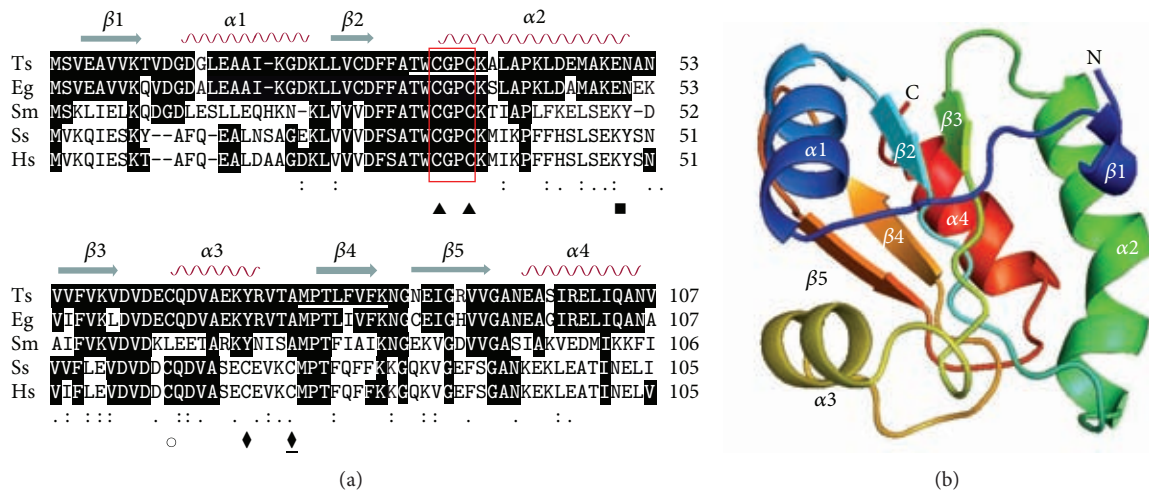


FIGURE 3: (a) Alignment of Trx-1 from *Taenia solium* (Ts. GenBank accession KM401605) with other thioredoxins from *Echinococcus granulosus* (Eg. GenBank: AF034637.1), *Schistosoma mansoni* (Sm. GenBank: AAL79841.1), *Sus scrofa* (Ss. GenBank NM\_214313.2), and *Homo sapiens* (Hs. GenBank AF085844.1). Identical residues are highlighted in white on a black background. The symbols in the residues indicate (-) absence and (: ) homology. Tyrosine 49 where nitration occurs (■) in mammalian. Cysteines: (▲) from active site, (○) conserved cysteine in mammalian and helminths, and (♦) only present in mammals where S-nitrosylation occurs; likewise (♦) it is involved in glutathionylation. In a box is the active site and underlined are the residues used for primer design to produce the Trx-1 probe. Secondary structure elements are shown above the alignment. (b) Structure model of TsTrx-1. It shows the Trx fold formed by a central domain with five-stranded  $\beta$ -sheet, surrounded by four  $\alpha$ -helices. The model was drawn with the Swiss Model program (<http://swissmodel.expasy.org/>).

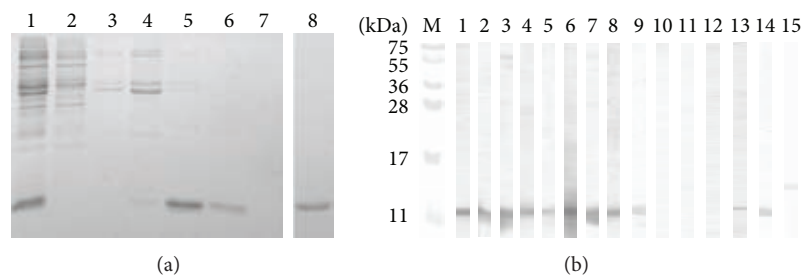


FIGURE 4: Purification process of the recombinant *T. solium* thioredoxin-1 (rTsTrx-1) and specificity of rabbit anti-TsTrx-1 serum. (a) 15% SDS-PAGE showing the crude extract of *Escherichia coli* produced with 4 M urea induced with IPTG, 1: after and 2: before. Crude extract was run through the nickel chelator column; 3: wash column. Eluted fractions with imidazole at 4: 50 mM, 5: 100 mM, 6: 200 mM, and 7: 400 mM. Eluted fractions from 100 and 200 mM were mixed and dialyzed and run through the same column to obtain 8: a pure rTsTrx-1. (b) Western blot showing the reaction from anti-TsTrx-1 serum with 1: pure rTsTrx-1 and crude extracts from 2: *Taenia solium* larvae, 3: *T. solium* adult, 4: *T. saginata* adult, 5: *T. taeniaeformis* adult, 6: *T. crassiceps* larvae, 7: *Hymenolepis diminuta* adult, 8: *Fasciola hepatica* adult, 9: *Entamoeba histolytica*, 10: *E. coli*, and 11: *Homo sapiens* recombinant Trxs. 12: a preimmune serum was incubated with a crude extract of *T. solium* larvae as a negative control. 13: *T. solium* cysticerci E/S Ag. Strips 14 and 15 show the rTrx-*E. coli* and Trx-*Homo sapiens* stained with Ponceau red. Molecular mass standards are indicated in the middle of both figures.

two conserved cysteines (Cys34 and Cys37) in its active site and cysteine 64, which is conserved in cestodes and mammalian, but it is not presented in *S. mansoni* Trx-1. Cysteine 27 is shared only by *T. solium* and *E. granulosus* Trx-1; unfortunately, its function is still unknown. *T. solium* and *E. granulosus* Trx-1 as well as *S. mansoni* lack tyrosine 49 and cysteines 69 and 73, present in mammals, which are involved in nitration, glutathionylation, and S-nitrosylation and dimer formation [20]. Figure 3(b) shows a model constituted by a central domain with five-stranded  $\beta$ -sheet, surrounded by four  $\alpha$ -helices, showing the classical Trx fold and the active site (CGPC) located between  $\beta$  strand 2 and  $\alpha$ -helix 2 [3].

**3.2. Production and Characterization of rTsTrx-1.** *Escherichia coli* containing the expression vector pRSETB with the coding region for TsTrx-1 were induced with IPTG for 4 h; bacteria were centrifuged and the pellet was disrupted with 4 M urea. Because rTsTrx-1 was produced with six histidines in the amino terminal, the supernatant was through to a nickel affinity chromatography. Figure 4(a) shows the expression levels of the recombinant enzyme in *E. coli* and the purification steps were run on a 15% reduced SDS-PAGE. Lane 1 shows all the soluble proteins from *E. coli* induced with IPTG (a large band ~12 kDa is highlighted in the sample), whereas lane 2 presents the soluble proteins from *E. coli* before induction with IPTG. Lane 3 shows the wash fraction

before the elution step. Imidazole fractions were showed at lanes 4 to 7 (50, 100, 200, and 400 mM); rTsTrx-1 was eluted in the 100 to 200 mM imidazole. These fractions were pooled and loaded again on the same nickel affinity chromatography, following the same procedure without urea. A single band with an apparent  $M_r$  of 12 kDa (rTsTrx-1) was obtained in fractions with 100 to 200 mM of imidazole (lane 8), pooled fractions were dialyzed in TrisED buffer, and protein concentration was determined. The entire process yielded 10 mg/L of culture medium. Figure 4(b) shows the strong recognition of a band of ~12 kDa by the specific anti-TsTrx-1 antibodies in the western blot membranes containing the purified rTsTrx-1 (lane 1), crude extracts from larvae (lane 2), and adult (lane 3) *T. solium* stages and crude extracts from adult *T. saginata* (lane 4), adult *T. taeniaeformis* (lane 5), larval *T. crassiceps* (lane 6), adult *Hymenolepis diminuta* (lane 7), adult *Fasciola hepatica* (lane 8), and a weakly recognition for *Entamoeba histolytica* (lane 9). Anti-TsTrx-1 antibodies were not recognized in *E. coli* (lane 10) and *Homo sapiens* (lane 11) Trxs. The preimmune serum obtained from rabbit before immunization (lane 12) also did not recognize any band. Additionally, anti-TsTrx-1 antibodies strongly recognized a ~12 kDa band in cysticerci *T. solium* E/S Ag. Strips 14 and 15 are *E. coli* and *Homo sapiens* Trxs stained with Ponceau red.

**3.3. Enzyme Activity and Optimal pH.** Figure 5(a) shows the insulin reduction activity performed with concentrations of 1 to 20  $\mu$ g of rTsTrx-1 at room temperature; all showed detectable insulin precipitation, but velocity and quantity of insulin reduction were dependent on rTsTrx-1 concentration. The maximal rate of precipitation was obtained with 20  $\mu$ g (1.5  $\mu$ M); however, there are no significant differences between 10 and 20  $\mu$ g; even 5  $\mu$ g reduced by half the amount of insulin precipitated. Therefore, the 20  $\mu$ g concentration was used for the characterization assays. Similar results were obtained with rTrx-*E. coli* (control assay) which showed a better activity at 20  $\mu$ g. A control reaction without rTsTrx-1 enzyme was carried out in parallel. Figure 5(b) depicts the enzyme exhibiting a triangle-shaped curve showing high activity (more than 84%) over a broad range of pH, between 6 and 7.5, but the optimal pH was 6.5 in PE buffer. The same figure shows that the activity was maintained around 58% at pH of 3, 5, 8, and 9 and was lost completely at pH 10.

**3.4. Temperature Effect.** Figure 6(a) shows the residual activity after exposing the rTsTrx-1 to different temperatures (15 to 100°C) at times (1, 3, and 24 h). The activity/temperature plots show a descending pattern. The enzyme maintained 100% activity for 3 h and lost it in 24 h at 37°C; at 55°C, 100% activity was maintained for 1 h; ~50% activity was lost at 3 h and lost activity completely in 24 h. Finally at 70 and 100°C, the enzyme lost ~50%, ~75%, and 100% of activity at 1, 3, and 24 h, respectively. As negatives controls, we used a similar reaction without the Trx enzyme at all times; as expected, there was no activity. Noteworthy is that the loss of activity was not reversible in any condition.

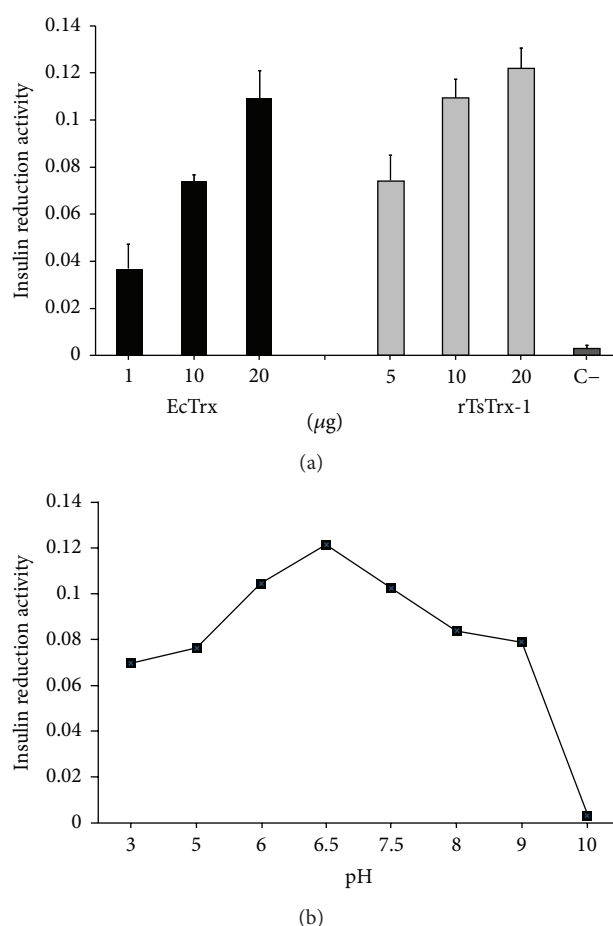


FIGURE 5: (a) Thioredoxin-catalyzed reduction of insulin. The increase in turbidity at 650 nm is plotted against the 1, 10, and 20  $\mu$ g of *E. coli* rTrx (dark bars) and 5, 10, and 20  $\mu$ g of *Taenia solium* thioredoxin-1 (rTsTrx-1, grey bars). (C-) Control lacking rTsTrx-1. (b) The pH enzymatic stability was determined incubating 20  $\mu$ g of rTsTrx-1 at different pH between 3 and 10. The residual activity was measured as before.

To determine the best temperature to store the rTsTrx-1, assays such as those showed in Figure 6(b) were done. It shows that the enzyme stored at 25°C gradually lost 10%, 30%, and 60% of activity at 3, 7, and 14 days, respectively; at this same temperature, the enzyme lost the activity completely at 28 days. Decrease in activity at 15°C was of 10, 33, 42, and 70% at the tested times. Storage at 4°C induced a ~10% activity loss at 14 days and activity loss of 50% at day 28, whereas storage at 20°C induced a gradual activity loss of 33%, 50%, 85%, and almost 100% between days 3 and 28; at -70°C, the enzyme presented the best stability; it lost only 9% activity at 3 days and ~25% of activity between days 7 and 28.

**3.5. Effect of NaCl, MG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Anti-TsTrx-1 Antibodies on rTsTrx-1.** Exposure of rTsTrx-1 at 37°C for 30 min to different NaCl concentrations showed that concentrations of 250, 500, 1000, 1500, and 2000 mM decreased its activity ~9, 17, 17, 40, and 50%, respectively (Figure 7(a)). Moreover, exposure of rTsTrx-1 at 3 mM MG decreased 25% of its

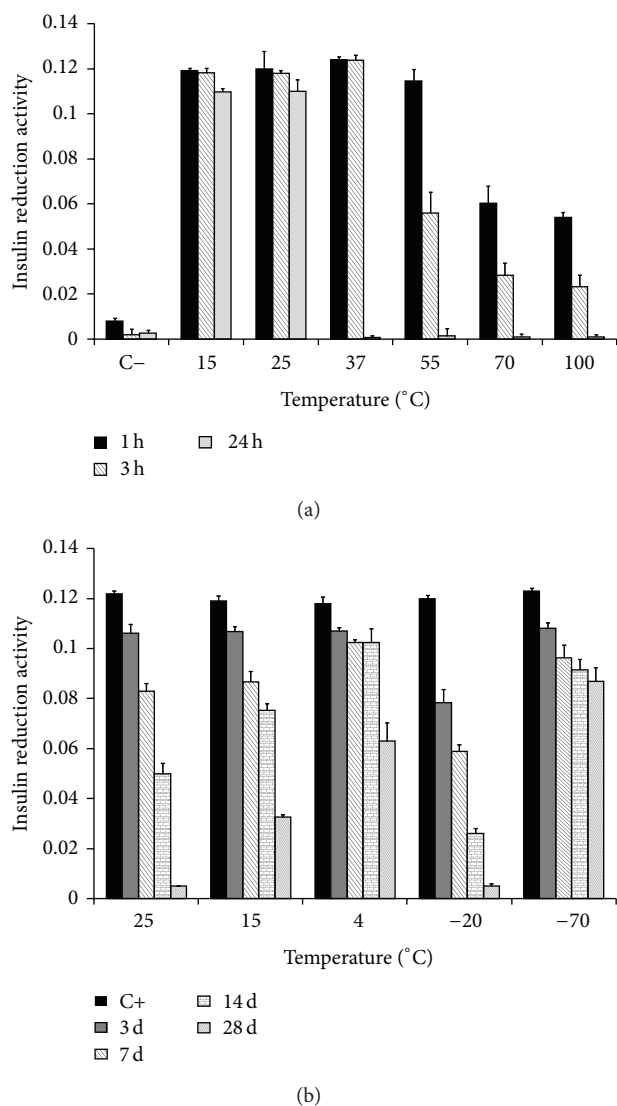


FIGURE 6: Effect of temperature on *T. solium* thioredoxin-1 (rTsTrx-1) activity. (a) rTsTrx-1 was incubated for 1, 3, and 24 hours at 15°C, 25°C, 37°C, 55°C, 70°C, and 100°C. (C-) Control lacking rTsTrx-1. (b) rTsTrx-1 was incubated during 3 to 28 days at 25°C, 15°C, 4°C, -20°C, and -70°C. (C+) Control of enzymatic activity was performed with a freshly made rTsTrx-1. Residual activity was determined by reduction of insulin assay.

activity, and higher concentrations inactivated rTsTrx-1 activity completely (Figure 7(b)). Concentration until 1 mM of  $H_2O_2$  did not affect the enzyme activity of rTsTrx-1, whereas concentrations between 10 mM and 100 mM of  $H_2O_2$  reduced the enzymatic activity (17, 25, 50, and 60%); concentration of 200 mM completely disrupted the activity (Figure 7(c)). A reaction without enzyme (negative control, C-) and a reaction with 1.5  $\mu$ M rTsTrx-1 without treatment (positive control, C+) were used as controls. As expected, no activity was detected in C-; in contrast 100% activity was obtained in C+. Finally, anti-TsTrx-1 antibodies were incapable of inhibiting enzymatic activity (Figure 7(d)) and, as expected, normal IgG did not affect the TsTrx-1 activity.

## 4. Discussion

The analysis of the 5'-flanking region of the *TsTrx-1* gene reveals putative sites for Nrf2 and XBP1 transcription factors; these sites are presented in promoters for typical 2-Cys-peroxiredoxin of *T. solium* and *Trx-1* from human genes and both factors are positive regulators of antioxidant genes under stress condition [9, 16, 21–23]. This suggests *Trx-1* gene in cestodes could be regulated in this way. On the other hand, a putative TATA box was found at -19 bp and a DPE putative site at +22 bp, both related to TSS. It is known that the TATA box usually appears at -30 bp and DPE at +28 to +32 bp, even in Taeniidae family genes [9, 24, 25], and, for these reasons, neither TATA box nor DPE in the *TsTrx-1* gene is at a classical distance to be functional [26]. However, these assertions must be corroborated with functional studies. The comparison analysis of Inr sequences from the *TsTrx-1* gene with other Inr sequences from genes of the Taeniidae family suggests conservation in this motif with similarities to the mammalian consensus Inr sequence YYANWYY [9, 13, 24–26].

Comparison analyses of the coding region for the *Trx-1* gene show that *T. solium* (0.605 kb) and *E. granulosus* (0.609 kb) were identical. Even *S. mansoni* *Trx-1* gene was showed to have similar structure with three exons and two small introns; the composition of nucleotides and amino acids sequences is different. In contrast, they are different from the structure of human (~17 kb) and mouse (13 kb) genes, which have five exons and four big introns. These differences between number and sequence of introns could be used to design specific primers for the diagnosis of cysticercosis/taeniasis caused by *T. solium* using PCR with cerebrospinal fluid (CSF) and human feces [27]. This point is important for epidemiological studies, because it would allow identifying active infection of carriers of this parasite, which will be easy to treat with antihelminthic drugs. Moreover, the difference in introns and the presence of an intron in the same position in different *Trx-1* genes of different organisms suggest that it was present in the ancestor; however more detailed studies should be done to use intron position as marker of evolution [28].

The confrontation of cysticerci with the host immune response (inflammation) and oxidative stress in tissues with high oxygen, such as brain and muscle, in contrast to the adult stage that lives in the small intestine, where it is exposed less to these factors, could be the reason why RNA expression of the *TsTrx-1* gene is higher in cysticerci than in adults.

The primary sequence shows a typical catalytic site (CGPC), which executes the oxidoreductase activity, and the typical thioredoxin fold; even more, it shows higher identity with Trx from *E. granulosus*, a cestode, less identity with *S. mansoni*, a trematode, and poor identity with pigs and humans (intermediate and accidental hosts of *T. solium*). Polyclonal antibodies produced against rTsTrx-1 strongly recognized a ~12 kDa band in various *Taenia* species and *E. hepatica* and weakly in *E. histolytica* but did not recognize *E. coli* and human Trxs. These points suggest that specific regions of TsTrx-1 could be used in vaccination assays against *T. solium*.

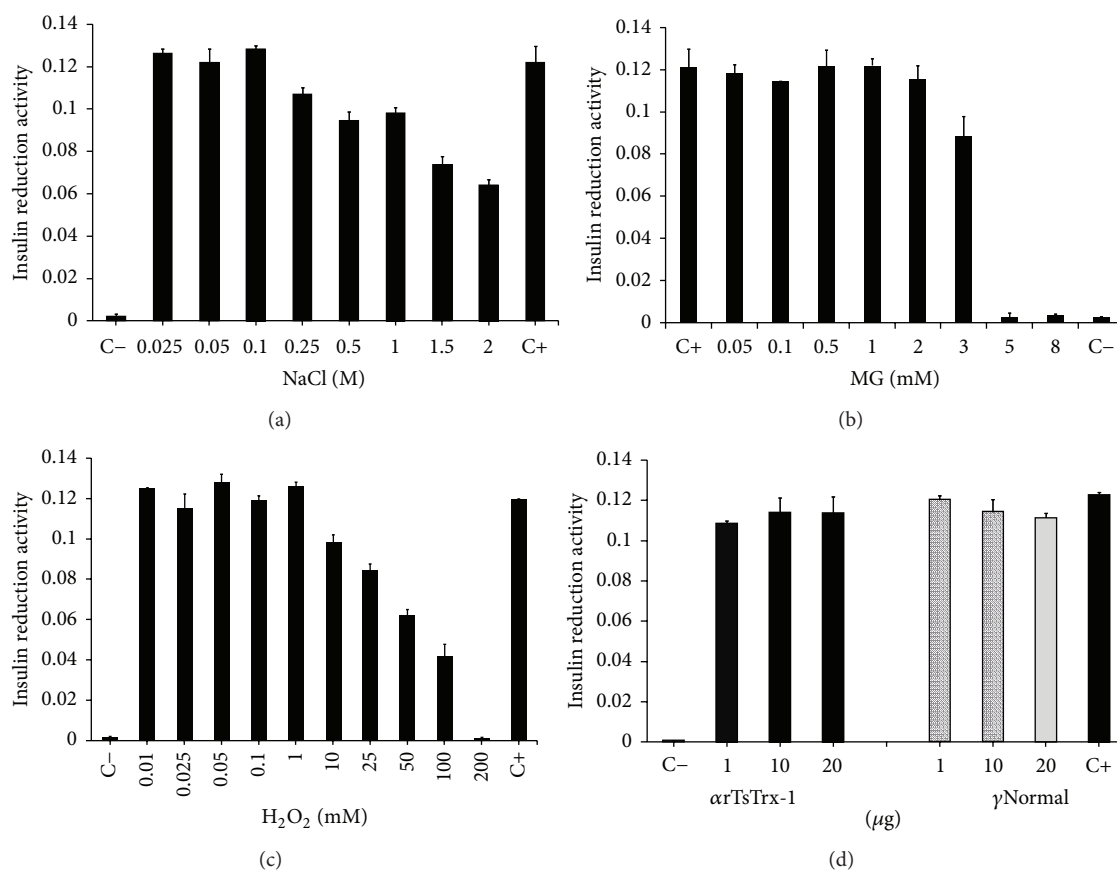


FIGURE 7: Effect on *T. solium* thioredoxin-1 (TsTrx-1) after incubation with different concentrations of (a) NaCl (25–2 M), (b) methylglyoxal (MG, 0.05–8 mM), (c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µM–200 mM), and (d) IgG rabbit anti-*T. solium* Trx-1 and IgG from preimmune serum (1, 10, and 20 µg). (C–) Control lacking rTsTrx-1 and (C+) control of enzymatic activity was performed with a freshly made rTsTrx-1.

Noteworthy, TsTrx-1, *E. granulosus*, and *S. mansoni* Trx-1 have a cysteine at position 27 close to the cysteines of the active site; moreover they lack cysteines 69 and 73, which regulate the activity and biological functions of the mammalian Trx-1. These findings give rise to the following questions. Does cysteine 27 have a role in the catalytical activity? Are the helminths Trx-1 not regulated by posttranscriptional modifications, and which is the biological consequence of this? [20].

The rTsTrx-1 enzyme exerted its optimal reductase activity in a range of pH and temperature of 6.5 to 7.5 and 4 to 37°C, respectively. Likewise, it presented 100% activity in a buffer with 100 mM NaCl and lost it gradually in a buffer with concentrations higher than 250 mM NaCl, losing up to 50% activity at 2 mM NaCl. On the other hand, the best way to store this enzyme to not lose its activity was at –70°C for 28 days and at 4°C for 14 days. The known biochemical properties of the enzyme, such as pH, temperature, buffers, cofactors, salt concentration, additives as glycerol, and oxidants and inhibitors, let us preserve its activity, which will help to determine enzymatic mechanisms with inhibitors or observe its effect on cells or organisms *in vitro* and *in vivo*.

The presence of MG and ROS especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> triggers oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in cells. MG is a reactive carbonyl compound that causes glycation of

proteins and is formed principally by glucose metabolism; it induces oxidative stress by inactivating antioxidant enzymes, such as Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and Trx reductase and decreases Trx protein level [29]. Activity of rTsTrx-1 was not affected by 2 mM of MG. On the other hand, ROS are continuously produced by the host's inflammation caused by the immune response. It is known that helminths lack catalase and present low activity of glutathione peroxidase; cysticerci of *T. crassiceps* (cestode) resist concentration of 2.5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* for 2.5 h. We observed that rTsTrx-1 enzyme resists 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Both findings indicate that rTsTrx-1 is highly resistant to oxidant molecules and, together with the 2-Cys-peroxiredoxins of *T. solium*, could constitute the hydroperoxides-regulating system in this parasite [8, 9].

Trx is an essential component of the thioredoxin system, where it performs functions such as antioxidative, protein-reducing, and signal-transducing ones. In mammalian and helminths, the antioxidative activity is the most studied. However, there is evidence that Trx participates in signaling pathways, interacting with different proteins, to control processes such as development, proliferation, migration, apoptosis, inflammation, and metabolism [30]. No signal sequence was found on the *TsTrx-1* gene; however Trx-1 was found in the cysticerci E/S Ag and several reports have observed

that mammalian cells stimulated with lipopolysaccharide and viral infections are able to secrete Trx-1 [31, 32]. In addition, now it is known that helminths constitutively secrete Trx-1 and molecules that are able to modify the immune response by altering the normal signaling of host immune cells, letting them drive Th2 immune response, which allows for their long term establishment, such as the cases of 2-Cys-peroxiredoxins from *S. mansoni* and *F. hepatica* [33, 34].

In conclusion, the Trx-1 tools presented here could help to perform studies to know the role that Trx-1 plays in the host-parasite relationship; likewise its antioxidant and biochemical properties could be used to inactivate TsTrx-1 by drug or by vaccine. Furthermore, its importance in immune signaling pathways could let us think of it as a therapeutical molecule to other diseases.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Authors' Contribution

Lucía Jiménez and Oscar Rodríguez-Lima contributed equally to this work.

## Acknowledgments

This work was supported by el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-176925) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT-IN215714). Abraham Landa and Oscar Rodríguez-Lima were supported by DGAPA-PASPA, UNAM, and CONACyT-240037, respectively; moreover Oscar Rodríguez-Lima is a student of Posgrado en Ciencias Bioquímicas (PMYDCB), UNAM.

## References

- [1] G. Powis and W. R. Montfort, "Properties and biological activities of thioredoxins," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 41, pp. 261–295, 2001.
- [2] H. Z. Chae, K. Robison, L. B. Poole, G. Church, G. Storz, and S. G. Rhee, "Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 15, pp. 7017–7021, 1994.
- [3] E. S. J. Arnér and A. Holmgren, "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 20, pp. 6102–6109, 2000.
- [4] E. Jortzik and K. Becker, "Thioredoxin and glutathione systems in *Plasmodium falciparum*," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 302, no. 4–5, pp. 187–194, 2012.
- [5] G. Salinas, M. E. Selkirk, C. Chalar, R. M. Maizels, and C. Fernández, "Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths," *Trends in Parasitology*, vol. 20, no. 7, pp. 340–346, 2004.
- [6] C. Chalar, C. Martínez, A. Agorio, G. Salinas, J. Soto, and R. Ehrlich, "Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 262, no. 1, pp. 302–307, 1999.
- [7] J. L. Rendón, I. P. del Arenal, A. Guevara-Flores, A. Uribe, A. Plancarte, and G. Mendoza-Hernández, "Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacystode (cysticerci)," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 133, no. 1, pp. 61–69, 2004.
- [8] J. Molina-López, L. Jiménez, A. Ochoa-Sánchez, and A. Landa, "Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*," *Journal of Parasitology*, vol. 92, no. 4, pp. 796–802, 2006.
- [9] F. Vaca-Paniagua, R. Parra-Unda, and A. Landa, "Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*," *Parasitology Research*, vol. 105, no. 3, pp. 781–787, 2009.
- [10] A. Mewara, K. Goyal, and R. Sehgal, "Neurocysticercosis: a disease of neglect," *Tropical Parasitology*, vol. 3, pp. 106–113, 2013.
- [11] M. S. Chong, C. P. Hawkins, G. C. Cook, C. H. Hawkes, and R. S. Kocen, "A resistant case of neurocysticercosis," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 67, no. 788, pp. 577–578, 1991.
- [12] M. S. Hasan, H. Bin Basri, L. P. Hin, and J. Stanslas, "Surgical remotion of a cysticercotic granuloma responsible for refractory seizures: a case report," *Surgical Neurology International*, vol. 2, article 177, 2011.
- [13] R. Parra-Unda, F. Vaca-Paniagua, L. Jiménez, and A. Landa, "Cu, Zn superoxide dismutase: cloning and analysis of the *Taenia solium* gene and *Taenia crassiceps* cDNA," *Experimental Parasitology*, vol. 130, no. 1, pp. 32–38, 2012.
- [14] A. Ochoa-Sánchez, L. Jiménez, and A. Landa, "The hamster model for identification of specific antigens of *Taenia solium* tapeworms," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 504959, 9 pages, 2011.
- [15] A. Holmgren, "Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, no. 19, pp. 9627–9632, 1979.
- [16] M. Kaghad, F. Dessarps, H. Jacquemin-Sablon, D. Caput, D. Fradelizi, and E. E. Wollman, "Genomic cloning of human thioredoxin-encoding gene: mapping of the transcription start point and analysis of the promoter," *Gene*, vol. 140, no. 2, pp. 273–278, 1994.
- [17] D. M. Church, L. Goodstadt, L. W. Hillier et al., "Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse," *PLoS Biology*, vol. 7, Article ID E1000112, 2009.
- [18] A. V. Protasio, I. J. Tsai, A. Babbage et al., "A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 1, Article ID e1455, 2012.
- [19] I. J. Tsai, M. Zarowiecki, N. Holroyd et al., "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism," *Nature*, vol. 496, no. 7443, pp. 57–63, 2013.
- [20] J. Haendeler, "Thioredoxin-1 and posttranslational modifications," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 8, no. 9–10, pp. 1723–1728, 2006.
- [21] B. Mai and L. Breeden, "Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17, no. 11, pp. 6491–6501, 1997.

- [22] Q. Ma, "Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 53, pp. 401–426, 2013.
- [23] H.-J. K. Hawkes, T. C. Karlenius, and K. F. Tonissen, "Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, no. 1, pp. 303–314, 2014.
- [24] A. Campos, P. Bernard, A. Fauconnier et al., "Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda)," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 40, no. 1, pp. 87–93, 1990.
- [25] C. M. D. da Silva, H. B. Ferreira, M. Picón, N. Gorfinkiel, R. Ehrlich, and A. Zaha, "Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 60, no. 2, pp. 209–219, 1993.
- [26] T. Juven-Gershon, J.-Y. Hsu, J. W. Theisen, and J. T. Kadonaga, "The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 253–259, 2008.
- [27] S. Rodriguez, P. Wilkins, and P. Dorny, "Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis," *Pathogens and Global Health*, vol. 106, no. 5, pp. 286–298, 2012.
- [28] M. Sahrawy, V. Hecht, J. Lopez-Jaramillo, A. Chueca, Y. Chartier, and Y. Meyer, "Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 42, no. 4, pp. 422–431, 1996.
- [29] R. Tatsunami, T. Oba, K. Takahashi, and Y. Tampo, "Methylglyoxal causes dysfunction of thioredoxin and thioredoxin reductase in endothelial cells," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 111, no. 4, pp. 426–432, 2009.
- [30] S. Lee, S. M. Kim, and R. T. Lee, "Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 10, pp. 1165–1207, 2013.
- [31] K. Ejima, T. Koji, H. Nanri, M. Kashimura, and M. Ikeda, "Expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in placenta of pregnant mice exposed to lipopolysaccharide," *Placenta*, vol. 20, no. 7, pp. 561–566, 1999.
- [32] B. Sahaf and A. Rosén, "Secretion of 10-kDa and 12-kDa thioredoxin species from blood monocytes and transformed leukocytes," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 2, no. 4, pp. 717–726, 2000.
- [33] S. Donnelly, C. M. Stack, S. M. O'Neill, A. A. Sayed, D. L. Williams, and J. P. Dalton, "Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages," *FASEB Journal*, vol. 22, no. 11, pp. 4022–4032, 2008.
- [34] K. Kunchithapautham, B. Padmavathi, R. B. Narayanan, P. Kaliraj, and A. L. Scott, "Thioredoxin from *Brugia malayi*: defining a 16-kilodalton class of thioredoxins from nematodes," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 7, pp. 4119–4126, 2003.

