

ARTICULO ORIGINAL

Detección y expresión de una proteína de unión a calmodulina en *Plasmodium falciparum*

Angela P. Guerra ¹, Víctor J. Vera ², María O. Rojas ^{1,3}, Moisés Wasserman ^{1,3}

¹ Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

³ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Se produjo un anticuerpo monoclonal a partir de proteínas de unión a calmodulina (PUCaM) aisladas por cromatografía de afinidad. Utilizando el inmunoensayo *Western blot* se detectó una proteína de 30 kDa en extractos de glóbulos rojos parasitados con *Plasmodium falciparum*. Esta señal no se observó en extractos de eritrocitos no infectados. Adicionalmente, este anticuerpo presentó una reacción con dos bandas de alto peso molecular localizadas en 260 y 240 kDa, siendo mucho más intensa la señal para 240 kDa. Estas mismas bandas fueron reconocidas por un anticuerpo policlonal anti-espectrina. Lo anterior implica que el anticuerpo monoclonal 1G3 presenta una reacción cruzada con las cadenas de la espectrina y sugiere la presencia de un epítipo similar o una estructura estrechamente relacionada en ambas proteínas.

Se estudió la expresión de esta proteína durante el ciclo de desarrollo del parásito y se pudo definir su presencia en las fases tardías del ciclo. La cantidad de la PUCaM de 30 kDa no sólo aumenta de manera absoluta, sino también relativamente con relación a las demás proteínas del parásito. El hecho de que se presente señal en los estadios avanzados de desarrollo y no en el estadio de anillos está indicando que tiene un patrón de expresión diferencial durante el desarrollo del parásito.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, proteínas de unión a calmodulina.

Detection and expression of a calmodulin binding protein from *Plasmodium falciparum*

Monoclonal antibodies were produced against affinity chromatography purified calmodulin binding proteins (CaMBP) of *Plasmodium falciparum*. Using one of them (1G3) in a Western blot assay, a 30 kDa calmodulin binding protein was detected in extracts of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. This protein was not detected in extracts of non infected erythrocytes. Additionally, the antibody presented a cross reaction with two bands 260 and 240 kDa, that reacted also with anti-spectrin policlonal antibody, suggesting that a similar epitope exists in the 30 kDa CaMBP and in spectrin. A study of expression of the 30 kDa CaMBP during the erythrocytic cell cycle showed a stage-specific expression pattern, detecting it only in the late stages of the parasite and not in the younger ones.

Key words: *Plasmodium falciparum*, calmodulin binding proteins.

Los organismos vivos han establecido varios mecanismos con los cuales traducen las señales extracelulares a un mensaje intracelular que puede ser entendido por la maquinaria bioquímica de la célula (1). En eucariotes, la proteína calmodulina

(CaM) está involucrada en la regulación de muchos procesos celulares controlados por las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} (2). Una vez la calmodulina es activada por la unión del calcio, experimenta cambios de conformación que le permiten interactuar con un amplio rango de enzimas y componentes del citoesqueleto (3-6), proteínas que se conocen como de unión a calmodulina, PUCaM. Las PUCaM están

Correspondencia:

mwasserman@hemagogus.ins.gov.co

Recibido: 05/11/01; aceptado: 20/02/01

implicadas en un gran número de funciones celulares ya sea a nivel de membrana plasmática, citoplasma o núcleo, lo que las convierte en elementos claves dentro de los múltiples procesos que se desarrollan en una célula.

En *Plasmodium falciparum* se ha informado la presencia de calmodulina en el extremo apical de los merozoitos (7) y se conoce que el calcio juega un papel determinante en diferentes eventos del parásito (8-10). Se ha propuesto que una entrada transitoria del catión en el glóbulo rojo puede actuar como un segundo mensajero, disparando una cascada de eventos moleculares que desembocan en la invasión del eritrocito por el parásito (11). Hasta el momento no han sido descritos eventos moleculares que involucren un sistema $Ca^{2+}/CaM/PUCaM$ en este parásito y no se han informado proteínas de unión a calmodulina. Para explorar este campo, se produjo un anticuerpo monoclonal contra una proteína de *P. falciparum* que fue aislada en nuestro laboratorio por cromatografía de afinidad utilizando columnas de CaM-agarosa; la afinidad de esta PUCaM por la calmodulina se confirmó en forma independiente con pruebas de coimmunoprecipitación con un anticuerpo contra CaM y por unión a CaM biotinilada de la proteína transferida a una membrana (12).

El anticuerpo monoclonal que aquí se describe nos permitió detectar la proteína de unión a calmodulina de 30 kDa en *P. falciparum* y establecer su patrón de expresión durante el ciclo celular eritrocítico.

Materiales y métodos

Cultivo de P. falciparum

Se cultivó la cepa colombiana FCB-2 según el método de Trager y Jensen (13) con eritrocitos humanos grupo 0 positivo al 5% de hematocrito, en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con Hepes 25 mM, hipoxantina 0,2 mM, $NaHCO_3$ 21 mM, glutatión reducido 0,86mg/l, sulfato de gentamicina 50 mg/l y suero humano al 10%. Las parasitemias obtenidas en promedio estuvieron entre 5 y 7%.

Obtención del extracto del parásito

Un cultivo asincrónico con, al menos, 7% de parasitemia se lavó (700 g, a 5 min) dos veces

con HBS isotónico (20 mM Hepes ácido, 160 mM NaCl); se retiró el sobrenadante y al precipitado obtenido se le agregaron 9 volúmenes de una solución de lisis (saponina 0,15% en HBS); se mezcló vigorosamente; se incubó durante diez minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 23.000 G por 10 minutos a 4 °C (*Himac centrifuge*-Hitachi rotor RPR 20-2). El precipitado de parásitos se lavó tres veces con HBS (23.000 g/5 min a 4 °C) y se le adicionaron 9 volúmenes de *buffer* de extracción (buffer E: Hepes-KOH 5 mM pH 7,5, Na_3EDTA 0,5 mM, Na_3EGTA 0,5 mM, Nonidet P-40 0,05%) y un coctel de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, benzamidina-HCl 0,01 mM, fenantrolina 1 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina A 10 µg/ml). La ruptura de los parásitos se realizó con un homogenizador de teflón a 7/10 de la velocidad máxima (*Homogenizer drive unit*-Bellco) por diez veces y en hielo. El homogenizado se sometió a un proceso de centrifugación diferencial empezando a 10.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se sometió a 100.000 g durante una hora a 4 °C (*Himac centrifuge* Hitachi-rotor RPS 65T-710). Finalmente, el sobrenadante de esta centrifugación se ajustó a 2 mM de DTT y 50 mM Hepes-KOH pH 7,5. La cuantificación de la proteína total de los diferentes lotes de extracto se realizó por el método de Bradford (14). Los extractos se separaron en alícuotas y se guardaron a -70 °C.

Inmunización de ratones

Los resultados obtenidos por Vera permitieron establecer la presencia de 9 PUCaM en *P. falciparum* con pesos moleculares que van desde 240 kDa hasta 20 kDa, aproximadamente (12). Con base en los resultados de la cromatografía de afinidad, la coimmunoprecipitación y la unión a calmodulina biotinilada, se escogió la PUCaM de 30 kDa para la producción del anticuerpo monoclonal.

La fracción de la cromatografía de afinidad con las proteínas de unión a calmodulina se concentró por ultrafiltración y se sometió a SDS-PAGE (15) preparativa. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se cortaron cuidadosamente para retirar la banda de interés (PUCaM de 30 kDa), con base en el patrón electroforético encontrado

(12). La banda se homogenizó por pases repetidos a través de dos jeringas y se inocularon aproximadamente 10 µg de proteína/inyección en ratones BALB/c por vía intraperitoneal. Se hicieron 4 inoculaciones: en la primera (día 1) se utilizó adyuvante completo de Freund; en la segunda (día 7) se usó adyuvante incompleto, y en la tercera (día 14) y cuarta (día 21) PBS (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, pH 7,2). Se realizó una quinta inoculación tres días antes de la fusión. La valoración del aumento del título de anticuerpos se determinó mediante el inmunoensayo Elisa.

Producción de hibridomas

Las células del bazo del ratón inmunizado se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón X63-Ag 8,653 y polietilenglicol al 41%. La selección de hibridomas se llevó a cabo en medio Dulbecco adicionado con hipoxantina, aminopterina y timidina al 2% (HAT 50x-Sigma) (16). Los sobrenadantes de los cultivos fueron probados por Elisa para establecer la presencia de anticuerpos. Se escogió uno de los híbridos positivos y se clonó tres veces sucesivas por el método de dilución límite. El tamizaje se hizo mediante *Western blot* con los sobrenadantes de los pozos de cultivo. El subclón escogido se denominó 1G3 y se inocularon 2,3 x 10⁶ células en un ratón para producir un tumor ascítico y obtener de éste el anticuerpo. La isotipificación de la subclase del anticuerpo se determinó en el fluido ascítico por un Elisa mediado por antígeno, usando antisueros específicos para clasificar las inmunoglobulinas de ratón (*mouse monoclonal antibody isotyping reagents*, Sigma).

Inmunoensayo Elisa

En este ensayo se utilizó un sistema de amplificación biotina-estreptavidina, como *buffer* de lavado TBST (20 mM TRIS/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20), como enzima fosfatasa alcalina y como sustrato p-nitro-fenilfosfato. Placas de poliestireno (*Immulon 2-Dynatech*) se cubrieron con 100 µl del extracto del parásito por cada pozo a una concentración final de 15 µg/ml en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,5 durante toda la noche a 4 °C. El antígeno no unido se removió mediante lavados y se adicionaron los

sobrenadantes puros de los híbridos durante 1 hora a 37 °C. Se lavó y se adicionaron las anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con biotina durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron con TBST y se adicionó la fosfatasa alcalina-estreptavidina durante 30 minutos a 37 °C. Se lavó y se adicionó el sustrato p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml en *buffer* sustrato (dietanolamina 1 M, MgCl₂ 0,5 mM pH 9,8) y se incubó a temperatura ambiente hasta desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción se frenó con 25 µL de EDTA 0,1 M y las lecturas se realizaron en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm. Como control negativo se utilizó sobrenadante puro de un cultivo de células de mieloma.

Transferencia y Western blot

El extracto del parásito se sometió a SDS-PAGE (15) y posteriormente se realizó la transferencia en cámara húmeda (*Hoefer Scientific Instruments*) a membranas de Immobilon PVDF (*Millipore*) durante 20 horas, 21 voltios y 4 °C de acuerdo con Towbin (17). Las membranas se cortaron en tiras y fueron bloqueadas durante toda la noche a 4 °C con una solución de TBST a la que se le añadió 5% de leche en polvo libre de grasa. Se guardaron a -20 °C en la misma solución hasta su uso. Las membranas se lavaron con TBST y se agregaron los sobrenadantes puros de los híbridos clonados, incubándolos durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las tiras se lavaron con TBST-leche y se adicionó anti-inmunoglobulina de ratón biotinilada (Dako) con incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con TBST-leche, se agregó la fosfatasa alcalina-estreptavidina (BRL) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tanto el anticuerpo secundario como la enzima se agregaron a diluciones previamente estandarizadas. En el último lavado se utilizó TBST sin leche y se adicionó el sustrato NBT/BCIP (Sigma) según indicaciones del fabricante, incubando por no más de 3 minutos.

Estudio de la expresión de la PUCaM de 30 kDa

Se tomaron 4 edades específicas a lo largo del ciclo de vida del parásito: 14, 28, 40 y 48 horas. Para realizar este estudio fue necesario recolectar

parásitos altamente sincrónicos, lo cual se llevó a cabo sometiendo los cultivos a un proceso de muy estricta sincronización y a una muy alta invasión (18-21). Una vez se obtuvieron los cultivos supersincrónicos de las 4 edades, se prepararon los diferentes extractos de acuerdo con la metodología previamente descrita. El diseño experimental que se siguió en el estudio de expresión permitió establecer el comportamiento de la PUCaM desde dos tópicos así:

- determinar la aparición de la proteína de 30 kDa a medida que avanza el ciclo celular del parásito y
- determinar la concentración relativa de la proteína de 30 kDa con respecto a las demás proteínas del parásito.

Para poder evaluar la expresión de la proteína como se mencionó previamente, fue necesario conocer tanto la cantidad de parásitos como la cantidad de proteína presente en cada uno de los cuatro extractos. Así, para determinar la aparición de la proteína durante el ciclo celular, se corrió una electroforesis cuyo gel se sembró con el mismo número de parásitos: $2,7 \times 10^7$ parásitos/carril para cada uno de los cuatro puntos escogidos. Posteriormente, se transfirió a una membrana PVDF y se realizó un *Western blot*, utilizando como anticuerpo primario el monoclonal 1G3. La segunda determinación se llevó a cabo de la misma forma con la diferencia de que el gel se cargó con la misma cantidad de proteína: 2,3 μ g/carril en los cuatro puntos. Se usaron geles con una concentración de acrilamida de 12% en *buffer* tris-glicina y condiciones denaturantes.

Resultados

Producción del anticuerpo monoclonal, isotipificación y detección de la PUCaM de 30 kDa

Después de la fusión, los sobrenadantes de los pozos en los que hubo crecimiento se probaron por Elisa para determinar la presencia de anticuerpos y se escogieron 3 híbridos positivos para ser clonados por el método de dilución límite. La clonación de los tres híbridos arrojó 16 clones que fueron probados por Elisa y por *Western blot*. De ellos se escogió el clon denominado 30kDaNo.3dil#4 para una nueva clonación y se

obtuvieron 8 clones positivos. Finalmente, para garantizar la pureza del clon escogido, se realizó una tercera clonación con 2 (C3 y E9) de los 8 clones anteriores y se obtuvieron 16 clones positivos por *Western blot* a partir de C3 y 10 a partir de E9. Todos ellos con excelentes características de crecimiento y de los cuales se seleccionó el clon 1G3 para la producción de fluido ascítico. Con este fluido se realizó la isotipificación por el método de Elisa mediado por antígeno, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma) y se determinó que el anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina de la clase M.

En la figura 1, los carriles 2, 3 y 4 muestran el patrón de reconocimiento de 3 sobrenadantes de los 16 clones probados para C3 y los carriles 5, 6 y 7 el patrón de reconocimiento de 3 sobrenadantes de los 10 clones para E9. El carril 2 corresponde

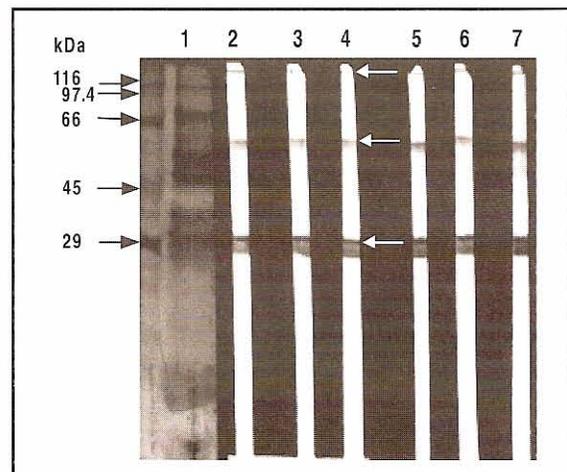


Figura 1. Tamizaje mediante *Western blot* de los clones C3 y E9.

El extracto del parásito fue sometido a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T12%) y transferido a membrana PVDF. Para la inmunorreacción, se utilizó como anticuerpo primario los sobrenadantes obtenidos durante la clonación de C3 y E9, un sistema de amplificación biotina-estreptavidina y fosfatasa alcalina. Los carriles 2, 3 y 4 muestran el patrón de reconocimiento para 3 de los clones provenientes de C3 y los carriles 5, 6 y 7 el patrón de reconocimiento para 3 de los clones provenientes de E9. El carril 1 corresponde a una sección de la membrana teñida con azul de Coomassie. Los carriles 2 al 7 presentan un patrón de reconocimiento exactamente igual para los 6 clones examinados; se observa una señal muy intensa a la altura de 30 kDa y dos señales adicionales en aproximadamente 60 kDa y 240 kDa. El carril 2 corresponde al clon 1G3, el cual fue escogido para la producción de fluido ascítico.

al clon 1G3. Los otros 20 clones también fueron probados y mostraron un patrón de reconocimiento exactamente igual (resultados no mostrados). La señal para la PUCaM de 30 kDa fue bastante intensa, aunque se observaron otras bandas de menor intensidad, lo cual sugiere la necesidad de titular el anticuerpo con el propósito de eliminar las interacciones no específicas y disminuir las señales de reacciones cruzadas. Para titular el anticuerpo monoclonal 1G3, se probaron diferentes diluciones del fluido ascítico, escogiéndose 1:1000 ya que en este título se obtuvo un reconocimiento específico para la PUCaM de 30 kDa y el ruido de fondo fue mínimo (figura 2). Adicionalmente, se observaron otras dos señales: una muy tenue en 60 kDa y una muy intensa en aproximadamente 240 kDa, señal ésta que no desapareció aún a altísimas diluciones. Al realizar este ensayo en geles con menor porcentaje de acrilamida, se pudo

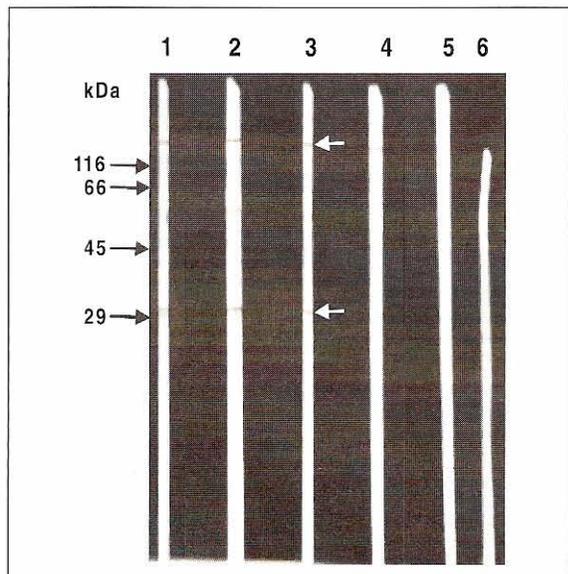


Figura 2. Titulación del anticuerpo monoclonal 1G3. El extracto del parásito fue sometido a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T12%) y transferido a membrana PVDF. Para el *Western blot*, se utilizó como anticuerpo primario el AcMo 1G3 en diferentes concentraciones, un sistema de amplificación biotina-estreptavidina y fosfatasa alcalina. Carril 1: dilución 1:200 del AcMo 1G3; carril 2: dilución 1:500; carril 3: dilución 1:1.000; carril 4: dilución 1:2.000; carril 5: dilución 1:5.000; carril 6: ensayo control con sobrenadante de células de mieloma. Se escogió como dilución de trabajo 1:1.000, ya que en ésta la señal para 30 kDa es intensa y el ruido de fondo es mínimo.

evidenciar que la banda de 240 kDa corresponde realmente a 2 bandas, una de aproximadamente 240 kDa y otra de 260 kDa. En la figura 3 se muestran los resultados del *Western blot* de geles de poliacrilamida al 7% cargados con extracto del parásito. El carril 1 corresponde al extracto del parásito transferido a membrana y teñido con azul de Coomassie donde se observan dos bandas que migran a la misma altura de la espectrina; en el

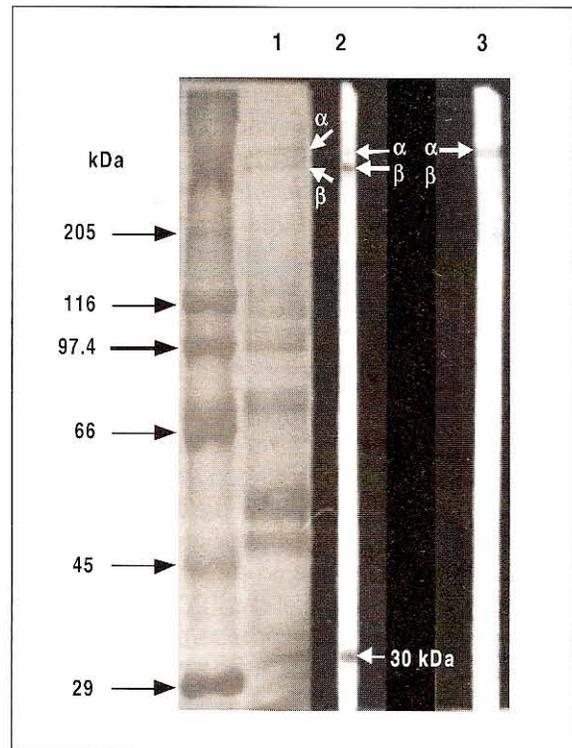


Figura 3. Detección de α y β espectrina utilizando el AcMo 1G3.

El extracto del parásito fue sometido a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T7%) y transferido a membrana PVDF. Para el *Western blot* se utilizó como anticuerpo primario el AcMo 1G3 y anti-espectrina humana. Carril 1: sección de la membrana teñida con azul de Coomassie; carril 2: reconocimiento con el AcMo 1G3; carril 3: reconocimiento con el anticuerpo policlonal anti-espectrina humana. El AcMo 1G3 reconoció 3 bandas, una en 30 kDa y otras dos en 260 kDa y 240 kDa, aproximadamente. La anti-espectrina presentó 2 señales, una muy débil en 240 kDa (cadena β) y otra más intensa en 260 kDa (cadena α). Las bandas reconocidas por la anti-espectrina son aparentemente las mismas bandas de alto peso molecular reconocidas por el AcMo 1G3, aunque la señal obtenida con este último anticuerpo para la banda de 240 kDa (cadena β) es muy intensa y para la banda de 260 kDa (cadena α) es muy débil.

carril 2 se utilizó el AcMo 1G3 como anticuerpo primario y se observaron 3 señales, una muy fuerte en 30 kDa y las otras dos en 260 y 240 kDa, siendo mucho más intensa la señal para esta última; en el carril 3 se usó anti-espectrina humana como anticuerpo primario y se presentaron dos señales, una muy débil en 240 kDa y una más intensa en 260 kDa. Las bandas reconocidas por la anti-espectrina son aparentemente las mismas bandas reconocidas por el AcMo 1G3. Esta reacción cruzada con una dupleta de proteínas localizada en 260 y 240 kDa corresponde a los mismos pesos moleculares informados por Forero (22) y Vera (12) para las cadenas α y β de una espectrina putativa presente en extractos radiomarcados de *P. falciparum*. Los anteriores hallazgos nos llevan a sugerir que el anticuerpo monoclonal reconoce un epítipo que es compartido por la PUCaM de 30 kDa y por las dos bandas que comigran con espectrina.

Origen de la PUCaM de 30 kDa

Se realizó un *Western blot* utilizando como antígeno, en el primer carril, extracto de parásito (6,7 μ g/carril) y en el segundo carril, extracto de eritrocito no infectado (16 μ g/carril) y como anticuerpo primario para ambos ensayos el AcMo 1G3. La figura 4 muestra en el carril 1 una señal a la altura de 30 kDa y en el carril 2, ausencia de la misma. Estos resultados prueban que la PUCaM en estudio proviene del parásito y no del eritrocito.

Adicionalmente, se observó otra señal en el carril 1 que podría corresponder a la β -espectrina presente en extractos del parásito y en el carril 2 otras 2 señales que corresponden una a la cadena β de la espectrina y la otra, posiblemente, a un producto de degradación de la espectrina eritroide. Claramente se evidencia que las señales para estas dos cadenas β no se ubican a la misma altura, es decir, la espectrina detectada en el parásito migra diferente a la del eritrocito.

Expresión de la PUCaM de 30 kDa

En el cuadro 1 se observa que la cantidad de proteína total aumenta a medida que progresa el ciclo celular, resultado que está de acuerdo con estudios previos relacionados con la síntesis de macromoléculas donde se informa un comportamiento bimodal para la síntesis de

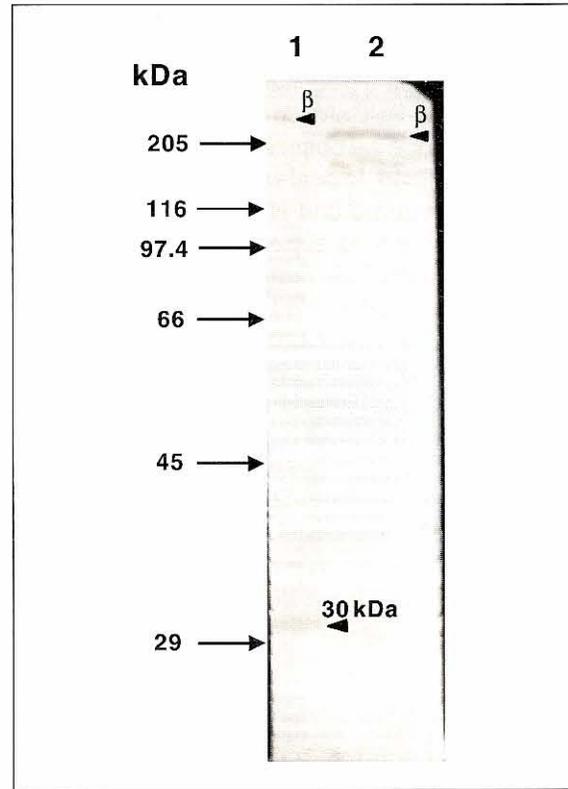


Figura 4. *Western blot* para confirmar el origen de la PUCaM de 30 kDa.

Extracto de *P. falciparum* y extracto de eritrocitos no infectados fueron sometidos a electroforesis denaturante en gels de poliacrilamida (T7%) y transferidos a membrana PVDF. Para la inmunorreacción, se utilizó como anticuerpo primario únicamente el AcMo 1G3. Carril 1: membrana con extracto del parásito; carril 2: membrana con extracto de eritrocito. En el carril 1 se observa una señal en 30 kDa, mientras que en el carril 2 hay ausencia de la misma. Estos resultados indican que la PUCaM de 30 kDa es una proteína del parásito y no del eritrocito. En el carril 1 también se observó una señal en 240 kDa (cadena β), que corresponde a la señal obtenida en el carril 2 en 220 kDa (cadena β eritroide). El AcMo 1G3 reconoce la PUCaM de 30 kDa y, además, tiene una reacción cruzada con las cadenas de la espectrina, presentando una mayor afinidad con la cadena β que con la cadena α .

proteínas con un primer pico entre las 20 y las 28 horas y uno mucho mayor entre las 32 y las 48 horas (23).

Los resultados de la figura 5 muestran la presencia de la proteína de interés y nos dan una indicación de su concentración a medida que progresa el ciclo celular, ya que la cantidad de parásitos en

Cuadro 1. Características de los extractos sincrónicos de 14, 28, 40 y 48 horas.

Parásitos edad/horas	Cantidad de parásitos recolectada	Proteína total μ g
14	$8,1 \times 10^9$	166,1
28	$7,1 \times 10^9$	153,5
40	$1,6 \times 10^9$	216,9
48	$4,1 \times 10^9$	406,4

todos los puntos seleccionados es la misma (sin embargo, se debe tener en cuenta que la cantidad de proteína total va aumentando a medida que el parásito se desarrolla). Se observa una señal a la altura de 30 kDa en los extractos de 40 y 48 horas, mientras que en los extractos de 14 y 28 horas está ausente. Esto indica que la PUCaM de 30 kDa se expresa en una manera estadio-específica durante los estadios tardíos de desarrollo, lo cual concuerda con el segundo pico de síntesis.

En la figura 6 se muestra la presencia de la proteína en relación con la proteína del parásito (la cantidad de proteína es constante en todas las muestras) y el patrón de expresión básicamente es igual al de la figura 5; es decir, se observa una señal a la altura de 30 kDa en los extractos de 40 y 48 horas pero no en los extractos de 14 y 28 horas. Estos resultados refuerzan los anteriores y a la vez muestran cómo esta proteína no sólo sufre un aumento absoluto en el parásito, sino también un aumento relativo con respecto a las demás proteínas del parásito a medida que avanza el ciclo. Es por ello que, teniendo la misma cantidad de proteína en todos los estadios, sólo se puede detectar en los avanzados y no en los tempranos. Posiblemente, esta proteína va sufriendo un efecto acumulativo desde que empieza a sintetizarse hasta llegar a su máxima expresión en parásitos de 48 horas, en los cuales se observa una señal más intensa. Esto debe querer decir, además, que la PuCaM de 30 kDa se libera al medio o se degrada entre la ruptura del esquizonte y la generación de anillos de 14 horas. Los resultados de este ensayo también muestran que el monoclonal 1G3 reconoce una proteína localizada entre 240 y 260 kDa en los extractos de 14 y 28 horas pero no en los de 40 y 48.

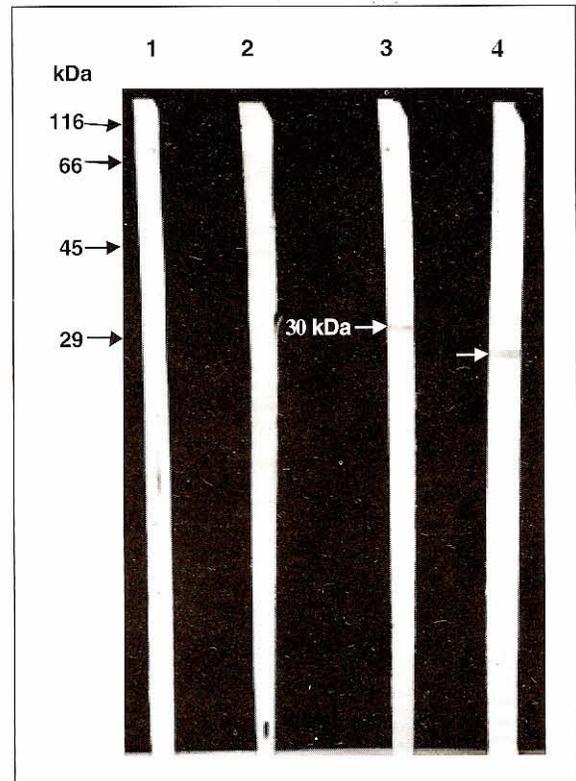


Figura 5. Cinética de expresión de la PUCaM de 30 kDa. Extractos de *P. falciparum* de 14, 28, 40 y 48 horas fueron sometidos a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T12%) y transferidos a membrana PVDF. Para el *Western blot*, se utilizó el AcMo 1G3 como anticuerpo primario. Carril 1: parásitos de 14 horas; carril 2: parásitos de 28 h; carril 3: parásitos de 40 h; carril 4: parásitos de 48 h. Para las 4 edades, se cargaron $2,7 \times 10^7$ parásitos con el propósito de obtener una indicación de la concentración de la PUCaM de 30 kDa a medida que progresa el ciclo celular. La proteína de 30 kDa sólo se detectó en parásitos de 40 y 48 horas, lo que sugiere que la proteína se expresa en una manera estadio-específica.

Por otra parte, teniendo en cuenta la observación relacionada con una localización aparentemente diferente de la señal para la PUCaM de 30 kDa en las tiras de membrana con los extractos de 40 y 48 horas, estos hallazgos nos hicieron sospechar que esta proteína podría estar experimentando modificaciones debidas a eventos de procesamiento. Para evaluar lo anterior, se realizó un nuevo *Western blot* en las mismas condiciones, pero utilizando una membrana completa (sin separar los diferentes carriles) y así determinar sin lugar a dudas la posición exacta de la señal.

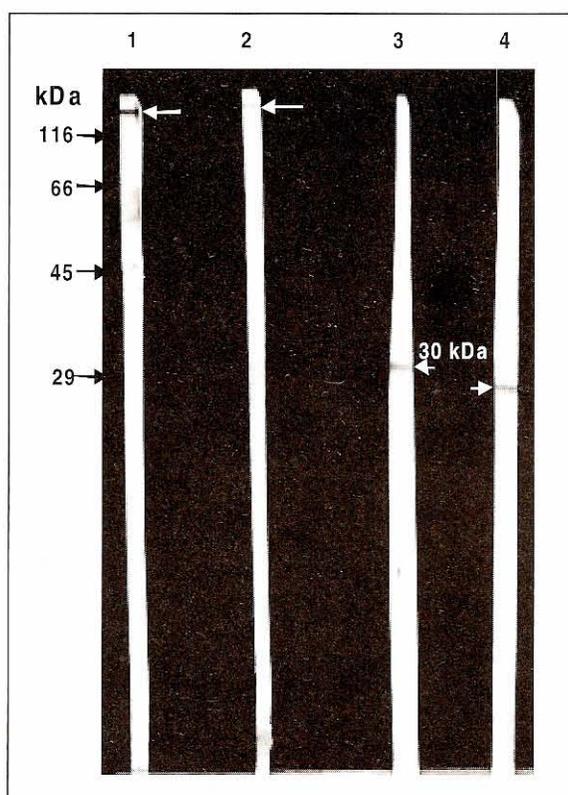


Figura 6. Cinética de expresión de la PUCaM de 30 kDa. Extractos de *P. falciparum* de 14, 28, 40 y 48 horas fueron sometidos a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T12%) y transferidos a membrana PVDF. Para el *Western blot* se utilizó el AcMo 1G3 como anticuerpo primario. Carril 1: parásitos de 14 horas; carril 2: parásitos de 28 h; carril 3: parásitos de 40 h; carril 4: parásitos de 48 h. Para los cuatro estadios, se cargaron 2,3 μ g de proteína, con el objeto de establecer la concentración relativa de la proteína de 30 kDa.

Los resultados (figura 7) muestran que la señal para la PUCaM tanto en el extracto de 40 como en el de 48 horas está a la misma altura, con lo que se descarta la posibilidad de un procesamiento de la proteína que modifique sensiblemente su peso molecular.

Discusión

Los hibridomas obtenidos después de la fusión de las células del bazo del ratón (inmunizado con una proteína de unión a calmodulina de 30 kDa de *P. falciparum*) con las células de mieloma, produjeron un anticuerpo monoclonal con el cual pudimos detectar la proteína en el parásito y establecer su patrón de expresión. Los resultados

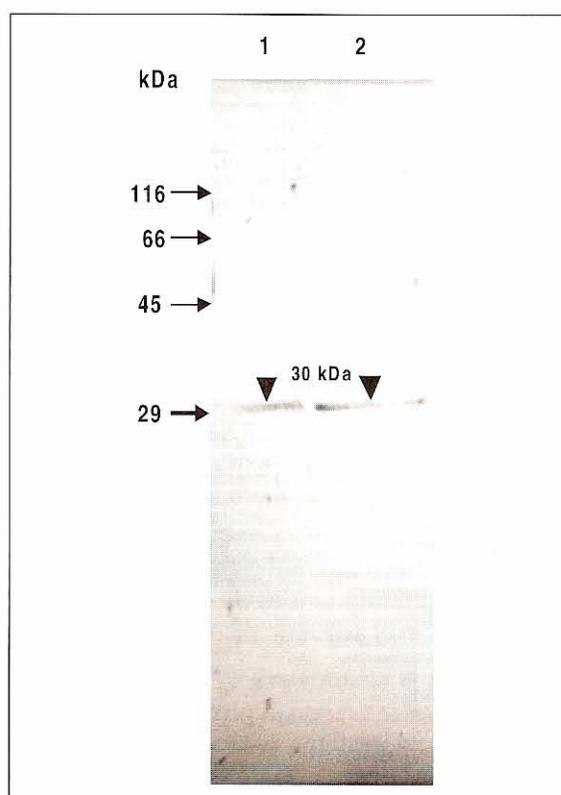


Figura 7. *Western blot* para definir la localización de la señal de la PUCaM de 30 kDa en parásitos de 40 y 48 horas. Extractos del parásito de 40 y 48 horas fueron sometidos a electroforesis denaturante en geles de poliacrilamida (T12%) y transferidos a membrana PVDF. La inmunorreacción se realizó con el AcMo 1G3. Carril 1: parásitos de 40 h; carril 2: parásitos de 48 h. En ambos carriles se observa una señal ubicada a la misma altura (30 kDa).

de los *Western blot* en los cuales se usó extracto del parásito como antígeno, mostraron una señal a la altura de 30 kDa, peso molecular que es semejante al de la PUCaM inoculada en los ratones. Esta señal no se observó al utilizar extractos de eritrocitos no infectados, resultado que confirma que esta proteína es propia del parásito. Se observó también una señal tenue en 60 kDa, señal que podría corresponder a un precursor de la proteína de 30 kDa. Además, el anticuerpo monoclonal 1G3 presentó una reacción cruzada con dos bandas de alto peso molecular localizadas en 260 y 240 kDa, siendo mucho más intensa la señal para la segunda banda. Estas masas corresponden a las de las cadenas α y β de la espectrina previamente informadas en los

eluidos de extractos del parásito marcados con ^{35}S -metionina que fueron retenidas por una columna de F-actina (22) y por otra de calmodulina (12). Nuestros hallazgos sugieren que las espectrinas presentes en extractos de *P. falciparum* posiblemente no corresponden a contaminación con espectrinas eritroides que quedan al separar los parásitos de los glóbulos rojos, puesto que estas últimas presentan un peso molecular más bajo. En los últimos años se ha descrito un gran número de moléculas de espectrina no eritroide en diferentes tipos celulares de vertebrados, principalmente en cerebro (29) y en las células en ribete de cepillo del intestino delgado (30). También ha sido informada en eucariotes unicelulares como *Acanthamoeba* (31), *Gregarinas* (32), *Trypanosoma* (33) y *Toxoplasma gondii* (34). En este último organismo se encontró una dupleta de 245 y 240 kDa antigénicamente relacionada con espectrina eritroide humana, proteínas que se localizaron en el complejo apical del polo anterior del parásito.

La espectrina es una proteína del citoesqueleto de las células eucariotas, cuya función general está relacionada con su habilidad para conectar las proteínas integrales de membrana con los filamentos de actina cortical. También se ha sugerido que podría estar involucrada en la organización de dominios receptores, en el control del transporte de vesículas a la membrana plasmática y en la formación y mantenimiento de uniones célula-célula (24, 25). Las cadenas α y β de la espectrina están compuestas de múltiples repeticiones de 106 residuos; sin embargo, ya que el anticuerpo monoclonal 1G3 presenta una señal mucho más intensa con la cadena β , se podría sugerir que el epítipo reconocido no está relacionado con estas repeticiones y tal vez se limita a una entidad única de la cadena β que no es compartida con la cadena α . Dentro de estos dominios propios de la subunidad β (26,27) se destacan el dominio de unión a ankirina, el dominio de unión a actina, dos dominios de homología a calponina dentro de la región de unión a actina, un dominio rico en serina en el extremo carboxilo, un dominio rico en prolina que participa en la autoasociación de la espectrina, un dominio rico en serina y treonina que conforma cuatro sitios

de fosforilación, una secuencia consenso para caseína cinasa y un dominio de homología a plecstrina PH (secuencia de aminoácidos que puede plegarse en un módulo compacto y funcional independiente de las secuencias que lo rodean; los dominios PH pueden asociarse a fosfolípidos o proteínas específicas y promueven la asociación de proteínas señalizadoras con las membranas (28)). Sin embargo, nada se puede aventurar con los actuales datos con respecto a cuál es el epítipo que comparten la PUCaM de 30 kDa y la cadena β de la espectrina, sobretodo teniendo en cuenta que la cadena α también es reconocida aunque muy débilmente.

Recientemente se ha informado sobre una abundancia significativa de ácido glutámico en algunas de las proteínas de *Plasmodium* y se ha visto que los anticuerpos originados contra estas proteínas tienden a reaccionar cruzadamente con otras proteínas ricas en este aminoácido. Varios antígenos de *P. falciparum* contienen bloques de repeticiones en *tandem*, ricos en residuos de ácido glutámico, entre los que se encuentran Pf155/RESA (35), GLURP (36), MESA (37), Ag332 (38), Pf11-1(39), D260 (40) y la fosfoproteína Pc(em)93 en *Plasmodium chabaudi* (41). Estas repeticiones se caracterizan por la presencia de pares de glutamato seguidas por un residuo hidrofóbico y se presume que este motivo puede ser la base para la reactividad cruzada de los anticuerpos entre las proteínas ricas en ácido glutámico en *P. falciparum* (42-45). La espectrina es rica en glutamato y está compuesta de repeticiones, aunque éstas son más degeneradas que las típicamente encontradas en las proteínas de *Plasmodium*. Esta característica podría sugerir que el anticuerpo monoclonal 1G3 reconoce esta clase de repeticiones y podría ser ésta la causa de la reactividad cruzada. Sin embargo, si éste fuera el caso, se esperaría obtener un mayor número de señales en el *Western blot*, ya que el anticuerpo reaccionaría con algunas de las otras proteínas ricas en ácido glutámico. Lo anterior pone de presente la necesidad de determinar con exactitud cuál es el epítipo reconocido y, por otro lado, la de conocer la secuencia completa de la proteína, lo que permitiría deducir homologías con base en motivos o estructuras específicas.

Observaciones similares al patrón de reconocimiento del AcMo 1G3 (proteína de interés y reacción cruzada en mayor extensión con la β -espectrina), se obtuvieron con el AcMo 16,8 dirigido contra una fosfoproteína de 65 kDa de *P. berghei*, rica en ácido glutámico, indicando algún grado de homología entre la espectrina y esa proteína (Wiser M., Universidad de Tulane, comunicación personal).

La isotipificación del anticuerpo monoclonal se realizó sobre fluido ascítico, ya que no se disponía del sobrenadante original del híbrido positivo escogido. No se recomienda determinar la subclase del anticuerpo usando un método directo en líquido ascítico, ya que éste posee inmunoglobulinas propias del ratón. Sin embargo, para obviar el problema, la isotipificación se realizó con un Elisa mediado por antígeno. La placa de micropozos se cubrió con el antígeno en estudio (PUCaM de 30 kDa presente en extractos del parásito) y posteriormente se adicionó el anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno, es decir, el anticuerpo monoclonal por tipificar. Luego de la remoción del anticuerpo no unido, se agregó el anticuerpo que reconoce la clase de inmunoglobulina. Hasta aquí se tiene un complejo en el que el anticuerpo que se isotipifica está unido específicamente al antígeno de interés; de esta forma se evitan reacciones inespecíficas con otros anticuerpos del fluido ascítico. Posteriormente, la técnica se continuó revelando con otro anticuerpo que está unido a biotina y con estreptavidina-fosfatasa alcalina como en la metodología normal de la prueba de Elisa.

Con el objeto de definir claramente el patrón de expresión de la PUCaM de 30 kDa, se utilizaron dos ensayos diferentes, ya que si únicamente se analizaban los *Western blot* cargados con un número igual de parásitos no se podía establecer si la señal observada correspondía en realidad a un determinado estadio del parásito o al aumento normal de la cantidad de proteína a medida que avanza el ciclo y el parásito crece; por esta razón, también se utilizó el sistema cargando en los geles una cantidad igual de proteína. Con base en los resultados de los *Western blot* de los extractos de parásitos sincrónicos, se puede afirmar que la proteína de unión a calmodulina de 30 kDa es expresada de una manera estadio-específica

únicamente en los estadios tardíos de desarrollo y no en el estado de anillos y trofozoítos jóvenes y que este patrón de expresión diferencial demuestra que la PUCaM de 30 kDa es regulada a lo largo del desarrollo del parásito. Debido a que su expresión solo se evidencia a partir de las 40 horas, se podría sugerir que la proteína puede estar involucrada en el ensamblaje de los nuevos parásitos, en el proceso de liberación de los merozoítos o en el de la invasión. Sin embargo, ya que esta proteína no aparece en el estadio de anillos, se podría sugerir que es liberada al medio durante la invasión, que se localiza en el espacio periplásmico o que sufre degradación. De todas formas es necesario llevar a cabo más estudios para determinar su participación en cualquiera de los eventos nombrados.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Salud, por el BID y por COLCIENCIAS, proyecto 2104-04170-95.

Referencias

1. **Cohen P, Klee CB.** Calmodulin. In: Molecular aspects of cellular regulation. Vol.5. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1988:313.
2. **Clapham DE.** Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-68.
3. **Klee CB, Crouch TT, Richman PG.** Calmodulin. *Ann Rev Biochem* 1980;49:490-515.
4. **Vanber Kum-Mf, George SE, Means AR.** Calmodulin activation of target enzymes. Consequences of deletions in the central helix. *J Biol Chem* 1990;265:3750-6.
5. **Heizmann C, Hunziker W.** Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *TIBS* 1991;16:98-103.
6. **Ikura M.** Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* 1996;21:14-7.
7. **Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, Aikawa M, Atkinson CT, Milhous WT.** Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites *P. falciparum*: implications for drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7310-4.
8. **Wasserman M, Vernet JP, Mendoza PM.** Role of calcium and erythrocyte cytoskeleton phosphorylation in the invasión of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 1990;76:681-8.
9. **Johnson JG, Epstein N, Shiroishi T, Miller LH.** Factors affecting the ability of isolated *Plasmodium knowlesi* merozoítos to attach to and invade erythrocytes. *Parasitology* 1980;80:539-50.

10. **Wasserman M, Alarcón C, Mendoza PM.** Effects of Ca^{2+} on the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:711-7.
11. **Wasserman M.** The role of calcium ions in the invasión of *Plasmodium falciparum* comentary. *Blood Cells* 1990; 16:450-1.
12. **Vera V, Wasserman M.** Aislamiento y caracterización de proteínas de unión a calmodulina en *Plasmodium falciparum*. Submitted, 2000.
13. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-5.
14. **Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HI, Speicher DW, Wingfield PT.** Current protocols in protein science. New York: John Wiley & Sons; 1996:3.4.10-3.4.11.
15. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
16. **Zola H, Brooks D.** Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies. In: Hurrell JGR, editor. Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications. Boca Raton: CRC Press; 1982.
17. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
18. **Rojas MO, Wasserman M.** Supersincronización del crecimiento in vitro de *Plasmodium falciparum*. *Biomédica* 1987;7:75-80.
19. **Lambros C, Vanderverg J.** Synchronization of *P. falciparum* erythrocytes stages in culture. *J Parasitol* 1979;65:418-20.
20. **Rivadeneira E, Wasserman M, Espinel C.** Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J Protozool* 1983;30: 367-70.
21. **Vernot JP, Wasserman M.** *Plasmodium falciparum*: increased and multiple invasion during short periods of time. *J Protozool* 1990;37:47-9.
22. **Forero C.** Proteínas de unión a actina en *Plasmodium falciparum* (tesis). Bogotá (Colombia): Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia; 1996.
23. **Rojas MO, Wasserman M.** Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Med Hyg* 1985; 79:792-6.
24. **Björk J, Lundberg S, Backman L.** Characterization of the binding of calmodulin to non-erythroid spectrin. *Eur J Cell Biol* 1995;66:200-4.
25. **Hu RJ, Watanabe M, Bennett V.** Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of beta-spectrin. *J Biol Chem* 1992;267:18715-22.
26. **Dhermy H.** The spectrin super-family. *Biol Cell* 1991;71: 249-54.
27. **Viel A, Branton D.** Spectrin: on the path from structure to function. *Curr Op Cell Biol* 1996;8:49-55.
28. **Pawson T.** Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995;373:573-6.
29. **Bennett V, Davis J, Fowler WE.** Brain spectrin, a membrane associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. *Nature* 1982;299:126-31.
30. **Glenny JR Jr, Glenney P, Weber K.** Erythroid spectrin, brain fodrin and intestinal brush border protein (TW 260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit band to a variant cell type specific unit. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1982; 79:4002-5.
31. **Pollard TD.** Purification of a high molecular weight actin filament gelation protein from *Acanthamoeba* that shares antigenic determinants with vertebrate spectrins. *J Cell Biol* 1984;99:1970-80.
32. **Ghazali M, Philippe M, Deguercy A, Gounon P, Gallo JM, Schrével J.** Actin and spectrin-like (Mr=260-240,000) proteins in *Gregarines*. *Biol Cell* 1989;67:173-84.
33. **Alcina A, Hargreaves AJ, Avila J, Hesketh JE, Fresno M.** The detection of a spectrin-like protein in *Trypanosoma cruzi* with a polyclonal antibody. *Cell Biol Int Rep* 1988;12:979-85.
34. **Ghazali M, Rodier MH, Moudni B, Babin P, Fernandez B, Jacquemin JL.** Detection and immunolocalization of human erythrocyte spectrin immunoanalogues in *Toxoplasma gondii*. *J Euk Microbiol* 1995;42:427-33.
35. **Coppel RL, Cowman AF, Anders RF, Bianco AC, Saint RB, Lingelbach KR, et al.** Immune sera recognize an erythrocyte *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 1984;310:789-92.
36. **Borre MB, Dziegiel M, Hogh B, Petersen E, Rieneck K, Riley E, et al.** Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 1991;49:119-31.
37. **Coppel RL.** Repeat structures in a *Plasmodium falciparum* protein (MESA) that binds to human erythrocyte protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* 1992;50: 335-47.
38. **Mattei D, Scherf A.** The Pf332 gene of *Plasmodium falciparum* codes for a giant protein that is translocated from the parasite to the membrane of infected erythrocytes. *Gene* 1992;110:71-9.
39. **Scherf A, Carter R, Petersen C, Alano P, Nelson R, Aikawa M, et al.** Gene inactivation of Pf11-1 of

- Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing-identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametogenesis. EMBO J 1992;11:2293-301.
40. **Barnes DA, Wollish W, Nelson RG, Leech JH, Petersen C.** *Plasmodium falciparum*: D260, an intraerythrocytic parasite protein, is a member of the glutamic acid dipeptide-repeat family of proteins. Exp Parasitol 1995;81:79-89.
 41. **Giraldo LE, Grab D, Wiser MF.** Molecular characterization of a *Plasmodium chabaudi* erythrocyte membrane-associated protein with glutamate-rich tandem repeats. J Eur Microbiol 1998;45:528-34.
 42. **Mattei D, Berzins K, Wahlgren M, Udomsangpeteh R, Perlmann P, Griesses HW, et al.** Cross-reactive antigenic determinants present on different *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens. Parasite Immunol 1989;11:15-30.
 43. **Ahlborg N, Berzins K, Perlmann P.** Definition of the epitope recognized by the *Plasmodium falciparum*-reactive human monoclonal antibody 33G2. Mol Biochem Parasitol 1991;46:89-96.
 44. **Wahlin B, Sjolander A, Ahlborg N, Udomsangpeteh R, Scherf A, Mattei D, et al.** Involvement of Pf155/RESA and cross-reactive antigens in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion *in vitro*. Infect Immun 1992;60:443-9.
 45. **Giraldo LE, Jennings GJ, Deleersnijder W, Hamers-Casterman C, Wiser MF.** Characterization of a *Plasmodium chabaudi* gene encoding a protein with glutamate-rich tandem repeats. Parasitol Res 1999;85:41-6.