

17
0.308 / 2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL CCH

ESTUDIOS MOLECULARES SOBRE EL
EPISOMA RIBOSOMAL DE Entamoeba
histolytica.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**MARIO ENRIQUE ZURITA
ORTEGA**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

RESUMEN

INTRODUCCION

BREVE DESCRIPCION DE LA AMIBIASIS Y
LA Entamoeba histolytica 1

GENERALIDADES SOBRE LOS GENES DE RNA RIBOSOMAL
Y ORGANIZACION DE ESTOS EN E. histolytica. 4

OBJETIVOS 6

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
Y RESULTADOS.** 8

DISCUSION
LOCALIZACION NUCLEAR DEL EPISOMA RIBOSOMAL 12

MAPA A SENSIBILIDAD A LA DNAasaI DEL EPISOMA RIBOSOMAL 13

INTERACCIONES DNA-PROTEINA QUE INCLUYEN
AL ELEMENTO DE 145 pb 14

MARIO ZURITA ORTEGA.

RESUMEN.

Entamoeba histolytica el agente etiológico de la amibiasis, es considerado como un eucariote primitivo. Este microorganismo carece de un citoesqueleto estructurado, de microtubulos, de un aparato de Golgi, de reticulo endoplásmico, de mitocondrias y de lisosomas típicos. El único organelo típico de célula eucariote presente en *E. histolytica* es el núcleo.

Recientemente ha sido reportado que los genes que codifican para el RNA ribosomal de *E. histolytica* estan localizados en una molécula extrachromosomal de 24.5 kb. Cada episoma contiene 2 copias de los genes ribosomales de forma repetida invertida y varias copias de un elemento repetido de funcion desconocida.

En este trabajo, reporto algunas características estructurales y funcionales del episoma ribosomal utilizando diferentes técnicas de biología molecular. Utilizando hibridaciones *in situ*, el episoma ribosomal fué localizado a lo largo de la membrana nuclear interna del trofozoito, sugiriendo que forma parte de la llamada cromatina periférica. Regiones de sensibilidad a DNAasa I fueron mapeadas y localizadas en los extremos de la región codificadora de los genes de rRNA. Otro sitio de sensibilidad a DNAasa I se encontró en regiones que contienen una secuencia de 145 pb que existe repetida en tandem.

Experimentos de geles de retardamiento y analisis de "footprinting", mostraron la existencia de factores nucleares que interaccionan de manera específica con el elemento repetido de 145 pb. Un analisis preliminar de los factores que interaccionan con el elemento repetido de 145 pb, mostró que un polipeptido de aproximadamente 28 kDa es el mejor candidato para interaccionar con el elemento de 145 pb. Estos resultados sugieren que un dominio dentro del elemento de 145 pb, con el cual interacciona una proteína, puede tener una función específica en el episoma ribosomal de *E. histolytica*.

MARIO ZURITA ORTEGA.

ABSTRACT.

Entamoeba histolytica, the etiologic agent of human amebiasis, is considered to be a very primitive eukaryote. It lacks a structured cytoskeleton and cytoplasmic microtubules, a Golgi complex, endoplasmic reticulum, mitochondria and typical lysosomes. In fact, the only typical eukaryotic organelle found in *E. histolytica* is nucleus.

Recently it was reported that the ribosomal RNA genes (rDNA) of *E. histolytica* are located in a circular extrachromosomal molecule of 24.5 kb.

Each episome contains two copies of the ribosomal genes, and several copies of repetitive DNA element of unknown function.

In this work I report structural and functional features of the extrachromosomal DNA element using a variety of techniques. Using *in situ* DNA hybridization, the element was found to be distributed along the inner phase of the nuclear membrane in the trophozoite stage, it appears to be part of the so called peripheral chromatin. DNAase I-sensitive regions on the episome were mapped and found to correspond to the borders of the ribosomal RNA coding region. Other DNAase I - sensitive regions were found to correspond to DNA containing a 145 bp sequence that exists in the episome as tandem repeats. Electrophoretic shift assays and footprinting experiments demonstrate the existence of specific nuclear factors that bind specifically to the 145 base pairs repeat. Preliminary analysis of the binding factors showed that a 28 kDa polypeptide is likely candidate for specific DNA:proteins interaction involving the repetitive element. These results suggest that a protein binding domain within the 145 bp repeat may have a specific function in the episome.

INTRODUCCION.

BREVE DESCRIPCION DE LA AMIBIASIS Y LA *Entamoeba histolytica*:

Existen en la literatura varias revisiones recientes sobre la amibiasis y el parásito que la ocasiona (Sepúlveda y Martínez-Palomo 1984,; Ravdin, 1986,1989; Martínez-Palomo, 1982,1986). En ellas puede encontrarse una amplia descripción y bibliografía específica a los puntos que se describen a continuación.

La amibiasis es una infección cosmopolita que, en la especie humana, es causada por el protozoario *Entamoeba histolytica*. La forma móvil del parásito, o trofozoito, vive en la luz del intestino grueso, usualmente como comensal. En este sitio se reproduce por partición o se diferencia, ocasionalmente, en su forma de resistencia, o quiste, que es la forma como se transmite la infección. Como comensal, la amiba *histolytica* no produce sintomatología en el hospedero (amibiasis luminal). Como patógeno, puede invadir la mucosa intestinal y ocasionar disentería o ameboma (amibiasis invasiva intestinal) y, por vía hemática, diseminarse a otros órganos, principalmente el hígado (amibiasis invasiva extraintestinal). Los seres humanos son los únicos reservorios y fuentes de infección.

EL PARASITO

El género *Entamoeba* pertenece a la familia Endamoebidae, la orden Amoebida, la subclase Rhizopoda y la clase Sarcodina. Incluye varias especies parásitas al hombre: *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *E. gingivali*. De éstas, solamente *E. histolytica* tiene importancia médica (Martínez-Palomo, 1986). La distinción principal entre las especies se basa en el número de núcleos que están presentes en el quiste maduro. Existen otras *Entamoebas* que no parasitan a la especie humana pero que son ampliamente utilizadas como referencias en los estudios de *E. histolytica*, éstas son: *E. histolytica* tipo Laredo y *E. moshkovskii*, así como *E. invadens* que puede producir amibiasis en reptiles carnívoros (Ravdin, 1989).

Los trofozoitos de *E. histolytica* (Martínez-Palomo, 1982, Sepúlveda & Martínez-Palomo, 1984) miden de 15 a 40 µm de diámetro; son muy activos, pleomórficos y en extremo sensibles a cambios físicos y químicos del medio ambiente. Su forma varía desde esférica hasta elongada con protrusiones (lobopodios) y, aunque no frecuentemente, forman un

uroide en el polo opuesto a la dirección en que se mueven. La superficie de los trofozoitos presenta también proyecciones filamentosas (filopodios) involucradas aparentemente en su fijación al epitelio intestinal.

La membrana plasmática de los trofozoitos tiene 10 nm de espesor y está cubierta por una cubierta muy tenue de glicoproteínas (Martínez-Palomo, 1982). Presenta gran movilidad en sus componentes, como puede apreciarse en el fenómeno de "capping" inducido por lectinas o anticuerpos (Pinto da Silva et al., 1975; Calderón et al., 1980). Los lípidos de la membrana han sido estudiados por Cerbón y Flores (1981). Existen diferencias cualitativas y cuantitativas con respecto a la composición de las membranas de células de mamíferos; destaca el predominio de fosfolípidos con etanolamina sobre los de colina y la presencia de un fosfolípido poco común, el aminoetilfosfonato de ceramida; este último es resistente a la acción de enzimas hidrolíticas del tracto gastrointestinal, así como a las fosfolipasas liberadas por el mismo parásito, mismas que han sido involucradas dentro de los mecanismos agresores de la amiba (McCaul et al., 1977). Aley et al. (1980) detectaron 12 glicoproteínas principales en fracciones purificadas de membranas plasmáticas; sus pesos moleculares variaron desde 12,000 hasta 200,000.

El citoplasma de las amibas tiene abundantes vacuolas; algunas de ellas contienen enzimas lisosomales. Contrario a lo que ocurre en los lisosomas convencionales las enzimas se encuentran unidas a la cara interna de la membrana vacuolar (Serrano et al., 1977). También se encuentran cuerpos cromatoides (agregados cristalinos de ribosomas inactivos), microfilamentos de actina, gránulos de glucógeno y un gran número de microcuerpos muy densos. Otros organelos, presentes en la mayoría de las células eucarióticas, no existen en la amiba, como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, centríolos y microtúbulos (Martínez-Palomo, 1982). El núcleo del trofozoito mide de 4 a 7 μ m de diámetro. La superficie interna de su membrana está recubierta uniformemente por aglomerados de cromatina lo que le da una apariencia anillada; sin embargo, en algunos casos se concentra hacia un lado en particular (Martínez-Palomo, 1982). También presenta un endosoma (cariosoma) central, de menor densidad cuando se compara con la cromatina periférica. Albach et al. (1980) marcó amibas con timidina y uridina tritiladas; la marca en el DNA se encontró distribuída aleatoriamente, en tanto que la del RNA se acumuló principalmente en

la cromatina periférica. Estos hallazgos sugirieron que la cromatina periférica es la contraparte del nucléolo eucariótico en tanto que el endosoma es un lugar de condensación del DNA (heterocromatina).

Los quistes son hialinos, redondos o ligeramente ovales, de 8 a 20 mm de diámetro y de pared refráctil. Teñidos con yodo, los de la especie histolítica muestran de 1 a 4 núcleos claramente distinguibles (Martínez-Palomo, 1982). Los esfuerzos para lograr enquistamiento de *Entamoeba histolytica* cultivada en medios axénicos han sido infructuosos, situación que ha limitado los estudios bioquímicos del proceso.

Dos de los aspectos más desconcertantes de la biología de *E. histolytica* son la gran variabilidad en su potencial patogénico y que la amibiasis invasiva esta restringida a ciertas áreas geográficas a pesar de la distribución mundial del parásito, si bien pueden ocurrir brotes epidémicos en cualquier lugar (Sepúlveda & Martínez-Palomo, 1982). En términos globales, los parásitos se comportan como comensales, es decir, viven, se multiplican y producen quistes en la luz del colon sin producir daños patológicos. Sin embargo, en algunas áreas de América Latina, Africa y Asia, las infecciones por *E. histolytica* están frecuentemente asociadas con las formas invasivas de la enfermedad. Durante mucho tiempo los estudiosos de la amibiasis han tratado de explicar esta conducta característica de la amiba histolítica -muchas veces comensal, algunas invasor- en base a 3 hipótesis (revisadas detalladamente por Martínez-Palomo 1982):

1. Hipótesis unística. *E. histolytica* es una sólo especie que siempre produce ulceraciones intestinales que pueden o no dar manifestaciones clínicas.

2. Hipótesis dualística. *E. histolytica* comprende dos especies diferentes de amibas morfológicamente similares pero sólo una de ellas es patogénica.

3. Hipótesis pluralística. *E. histolytica* es una especie compuesta por un número desconocido de cepas patogénicas (invasivas) y no patogénicas (comensales). Esta es la hipótesis que actualmente tiene más prevalencia. Si estas cepas debieran o no considerarse como especies diferentes es motivo de discusión.

GENERALIDADES SOBRE LOS GENES DE RNA RIBOSOMAL Y ORGANIZACION DE ESTOS EN *E. histolytica*

Debido a que su caracterización física ha sido fácil, los genes de RNA ribosomal han sido estudiados en detalle en un gran número de organismos procariotes y eucariotes. En eucariotes generalmente se encuentran en varias copias por genoma haploide y al igual que los procariotes presentan regiones altamente conservadas en el transcurso de la evolución. Esto ha permitido que su clonación sea relativamente sencilla utilizando sondas heterólogas. En eucariotes las regiones de DNA que contienen a los genes ribosomales activos son ensamblados alrededor de ellos mismos en el organelo conocido como nucleólo. Dentro de este organelo el rRNA es transcrito, procesado y ensamblado dentro de las subunidades ribosomales para su posterior transporte al citoplasma. El nucleólo contiene alrededor de 100 diferentes proteínas y ácidos nucleicos, incluyendo a la RNA polimerasa I, factores transcripcionales, enzimas de procesamiento, proteínas ribosomales, el RNA 5S, RNA's nucleares pequeños (snRNA) y otros componentes. El nucleólo en mamíferos contiene subestructuras bien definidas catalogadas a partir de su apariencia en el microscopio electrónico.

Estas subestructuras son: a) los centros fibrilares, que contienen el DNA ribosomal así como RNA polimerasa I y topoisomerasa I; b) componentes fibrilares densos, que contiene proteínas asociadas al RNA U3 que es necesario para el procesamiento de rRNA (Reeder, 1990); y c) un componente granular que es una estructura compuesta de los precursores de las partículas ribosomales en los últimos estadios de maduración (Reeder, 1990). El componente central de el nucleólo es el DNA ribosomal, que generalmente está organizado en repeticiones en tandem que codifican para el precursor del rRNA.

En eucariotes los genes para la subunidad pequeña (16-18 S), la subunidad grande (24-28 S) y el RNA 5.8 S se encuentran formando un cistron que es transcrito por la RNA polimerasa I (Fig 1). Este transcrito generalmente contiene una secuencia líder y regiones espaciadoras intergénicas no codificadoras que son procesadas del transcrito policistrónico (Sollner-Webb and Tower, 1986). Dentro de las regiones altamente conservadas existen secuencias de DNA que son invariables (es decir que no han cambiado en 3×10^6 años de evolución). Las regiones variables han sido utilizadas eficientemente en estudios evolutivos, que permiten realizar una confiable clasificación filogenética (Stahl, 1986).

ORGANIZACION DE LOS GENES DE rRNA EN EUCARIOTES SUPERIORES

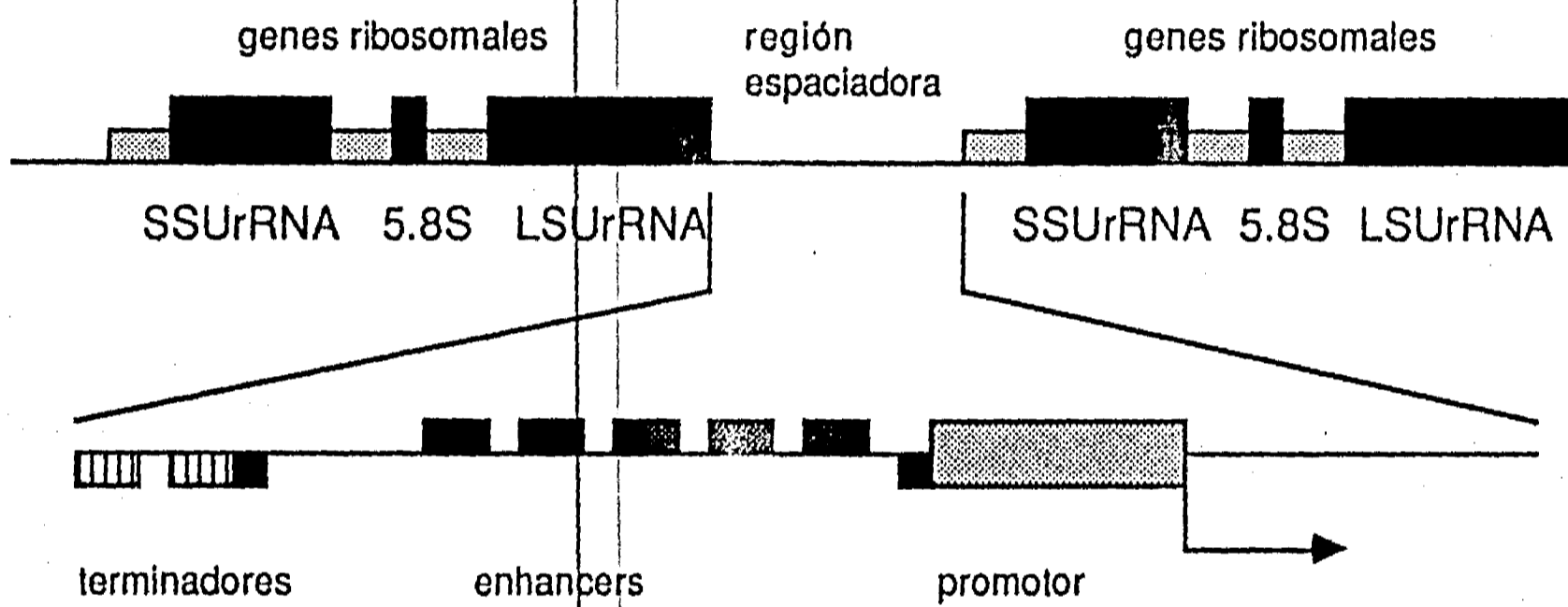


FIGURA 1

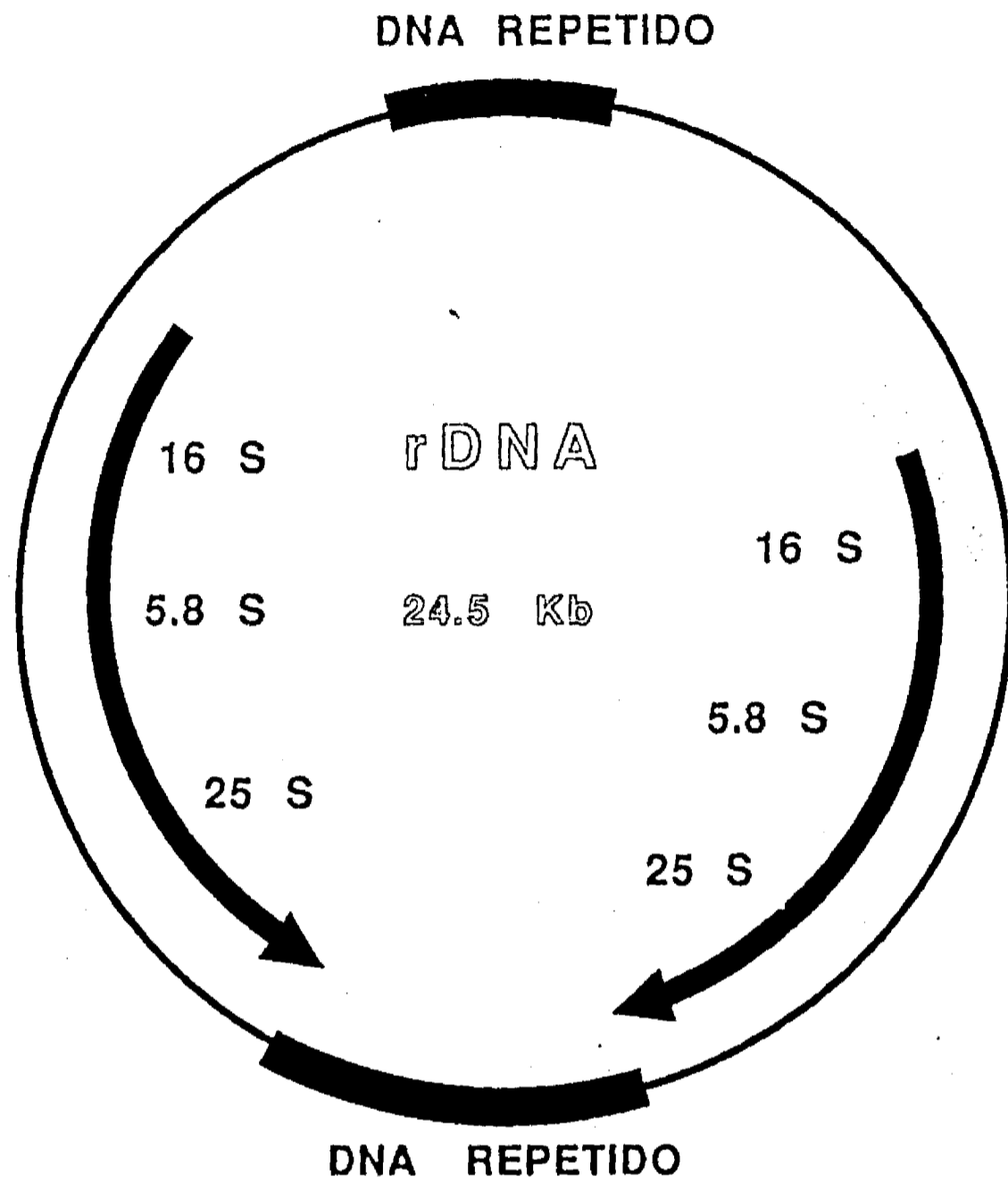
Los genes de RNA ribosomal han sido también utilizados como modelo para el estudio de los mecanismos de activación de la transcripción en procariotes y eucariotes. A diferencia de la RNA polimerasa II y RNA polimerasa III que reconocen una amplia variedad de promotores, la RNA polimerasa I aparentemente inicia la transcripción a partir de un solo tipo de promotor (Sollner-Webb and Tower, 1986). Este limitado rango de promoción esta reflejado en la estricta especificidad de transcripción entre especies por la RNA polimerasa I. Estudios utilizando células intactas o sistemas de transcripción *in vitro* han mostrado que especies cercanas en la evolución (ratón y rata) contienen factores funcionales que son intercambiables en tanto que especies más distantes han evolucionado propiedades de reconocimiento del promotor que son incompatibles (Grummt et al. 1982; Onishi et al. 1984). Una excepción ha esto es el caso de que factores transcripcionales de ratón que son capaces de iniciar la transcripción de promotor de rRNA de *Xenopus* 4 nucleótidos hacia arriba del sitio normal de inicio (Pape et al. 1990). El alineamiento de diferentes promotores ha mostrado que existe muy poca similitud entre especies cercanas (Financsek et. al 1982). Esta evolución rápida de los promotores de rRNA debe de ser compensada por cambios significativos en la maquinaria transcripcional, lo que resulta en la incompatibilidad de transcripción entre diferentes especies (Dover and Flavell 1984). A pesar de que la RNA pol I exhibe propiedades de especie-especificidad, estudios con elementos de DNA que actúan en cis así como con factores que actúan en trans, han revelado algunas características comunes. El análisis de promotores para los genes de rRNA de mamíferos ha mostrado que su estructura general es similar en algunos elementos que actúan en cis que van desde la posición -200 hasta pasar el sitio de inicio de la transcripción (Sollner-Webb and Tower 1986). Estudios bioquímicos han revelado similitudes importantes entre el aparato transcripcional de diferentes especies. En la mayoría de los casos al menos dos factores transcripcionales son requeridos adicionalmente a la RNA polimerasa I para dar una eficiente iniciación (Sollner-Webb and Tower 1986). Algunos de estos factores transcripcionales han sido purificados y sus respectivos genes clonados permitiendo un estudio más detallado del mecanismo de transcripción por medio de la RNA pol I. Por ejemplo el factor humano hSL1 no tiene propiedades de unión al DNA, pero puede interaccionar con la RNA pol I a través de un segundo factor llamado hUBF el cual es capaz de reconocer una secuencia específica localizada varias veces hacia arriba del inicio de la transcripción. Este factor presenta varios dominios con identidad significativa con las proteínas nucleares pertenecientes al tipo de "high mobility group 1" (HMG1) (Jantzen et al. 1990). A pesar de que hay muchas diferencias entre las secuencias de DNA de los promotores de diferentes especies, se conserva la especificidad de UBF (Bell et al. 1989, Dunaway 1989, Pikaard et al. 1989). Por lo tanto la especificidad no parece estar dada por las

propiedades de unión al DNA del factor UBF sino que interacciones proteína-proteína son los determinantes en la especificidad, por lo menos en vertebrados (Bell et al 1989).

En el caso de protozoarios no se conoce prácticamente nada de los mecanismos de transcripción y procesamiento del RNA ribosomal. Sin embargo, se ha encontrado que la organización y expresión de estos genes presenta particularidades interesantes. Por ejemplo, en los tripanomastidios como es el caso de *Critidia fasciculata*, los rRNA's para la subunidad grande se encuentran fragmentados en 6 moléculas independientes. En *Trypanosoma cruzi* la especie molecular 24 S se encuentra constituida por 2 moléculas de igual tamaño, unidas por enlaces de hidrógeno. Un caso sumamente interesante es el de *Plasmodium bergui*, donde se han encontrado dos unidades transcripcionales de DNA ribosomal, cada una con dos copias, las cuales producen moléculas de RNA similares, pero que en donde tanto las secuencias espaciadoras intergénicas, como las secuencias flanqueadoras son diferentes. Los transcritos de estos genes se expresan diferencialmente en las dos etapas del ciclo de vida; uno en el mosquito y otro cuando el parásito se encuentra en el flujo sanguíneo del huésped mamífero, sugiriendo que puede existir un control diferencial de la transcripción de estos genes. (Spencer, et al. 1987; Gunderson, et al. 1987; Federoff, 1979).

En cuanto a *Entamoeba histolytica*, recientemente se ha reportado que los genes de RNA ribosomal (rDNA) se encuentran localizados en una molécula extracromosomal circular de aproximadamente 24.5 Kb que parece ser un replicón autónomo del resto de los cromosomas (Huber et al. 1989; Bhattachayra, 1989). No ha sido descartada la presencia de copias de dichos genes en los cromosomas, pero por lo menos la mayoría de estos se encuentran en este elemento circular que esta entre 200 a 300 copias por núcleo (Huber et al. 1989). Cada episoma contiene 2 copias de los genes ribosomales en posición repetida invertida (Fig 2), aunque datos recientes obtenidos por Bertha Michel en nuestro laboratorio muestran que en algunas cepas el cistron ribosomal solo esta presente en una copia por episoma. También en este plásmido existen regiones que contienen secuencias de DNA repetidas en tandem y semidispersas de las cuales se desconoce su función. (Huber et al 1989, Samuelson et al. 1990). Uno de estos elementos repetidos llamado p145 (de 145 pb de longitud) presenta la característica de variar en diferentes cepas (clonas) de *E. histolytica*. En cepas llamadas patogénicas (que presentan un patrón de zimodemos patógeno, Garfinkel et al. 1990)

EPISOMA RIBOSOMAL DE E. HISTOLYTICA



contienen su episoma al elemento p145 y en cepas no-patógenas existe un elemento repetido de 133 pb con cierta homología al p145 (aproximadamente 44% de identidad, Garfinkel et al. 1990). Ha sido reportado por el grupo de Mirelman en Israel que cuando una clona de *E. histolytica* con zymodemos patógenos es incubada en un medio monoaxénico el patrón de zymodemos cambia al llamado no-patogénico y además que esta conversión puede ser revertida si esta cepa es propagada en un medio axénico nuevamente. Así mismo este grupo ha reportado que también la secuencia repetida de 145 pb presente en cepas patógenas cambia a la de 133 pb y después cuando la cepa es nuevamente incubada en condiciones axénicas la secuencia p145 está presente de nuevo (Garfinkel et al. 1990). Esta conversión implica la existencia en la amiba de copias maestras de los genes ribosomales las cuales contienen cada una de las repeticiones. Sin embargo, estos datos son muy difíciles de conciliar con los datos reportados por Tannich et al. (1990), quienes han encontrado diferencias significativas a nivel de la organización genómica y de secuencia nucleotídica de genes estructurales en diferentes cepas de *E. histolytica* (patógenas y no-patógenas) aisladas en diferentes lugares del mundo. Esto último sugiere que las amibas con patrón de zymodemo patógeno son una especie diferente a las de zymodemo no-patógeno. Independientemente de esta controversia, es claro que un estudio más detallado de la organización y expresión de los genes de RNA ribosomal de la amiba será relevante en el estudio a nivel molecular del genoma de este parásito.

OBJETIVOS:

Durante los últimos años, el avance básico y metodológico en Biología Molecular ha permitido extender esta disciplina a organismos que no son considerados modelos clásicos en esta área del conocimiento, dentro de éstos se encuentran los parásitos. Es posible que a largo plazo, la información obtenida a nivel molecular permitirá el diseño de nuevas estrategias para combatir diferentes tipos de parásitos.

Como anteriormente se ha mencionado, la amiba además de ser un problema de parasitosis importante, presenta características únicas con respecto a otros eucariotes. Por lo tanto, la información obtenida a través del uso de técnicas de biología molecular, contribuirá a entender mejor a dicho organismo.

Cuando se decide trabajar a nivel molecular en un organismo que no es un modelo clásico de estudio, es muy difícil plantearse preguntas acerca de la biología molecular del mismo. Por lo

tanto desde mi punto de vista, el desarrollo de hipótesis solo se logra después de iniciar una exploración a nivel molecular. Una vez obtenida dicha información es cuando nos podemos plantear preguntas relacionadas a la regulación del genoma del organismo en estudio, objetivo fundamental del biólogo molecular. .

Al iniciarse este trabajo la información a nivel molecular de *E. histolytica* era prácticamente nula. Se utilizó la poca información existente para iniciar una exploración de la amiba.

Como se mencionó los genes de RNA ribosomal de *E. histolytica* se encuentran localizados en un elemento extracromosomal de aproximadamente 24.5 Kb. Esto fue tomado como base para iniciar este trabajo. Por estar presente en un alto número de copias por célula y el gran conocimiento que se tiene de los genes de rRNA, se consideró que el episoma ribosomal puede ser un buen modelo para iniciar el estudio sobre la organización y expresión del genoma amibiano. Otro antecedente importante que fue tomado en cuenta, por considerarlo sumamente atractivo, es el hecho de que el núcleo de *E. histolytica* no presenta un nucleólo, que es el lugar en donde se localizan y transcriben los genes de RNA ribosomal en la mayoría de los eucariotes. Este hecho sugiere una situación diferente para los genes de rRNA en la cromatina de *E. histolytica*.

En base a esto se planteó como objetivos Iniciales localizar la región nuclear de los genes de RNA ribosomal de *E. histolytica*, Iniciar estudios encaminados definir la cromatina presente en dichos genes e identificar factores que Interaccionen con el rDNA. En paralelo hemos desarrollado investigaciones enfocadas ha entender el promotor de los genes de RNA ribosomal de *E. histolytica*, sin embargo esto no será incluido en esta tesis.

SECUENCIA DEL ELEMENTO REPETIDO DE 145 pb

20 40
GATCGATTTTCCCAGTTAGA AATTATTG'ACTTTGTATTT
60 80
AGTACTTTTCATTAAAAATGGTGAGGTTCTTAGGAAATCC
120
GAAAATCAACGGTGTAATTGGTCAAAAAATATTTTGCCT
140
AGACGACGACCATTTTGAATAATTCGATC

FIGURA 3

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y RESULTADOS:

La mayoría de los resultados se presentan en el artículo anexo que fué aceptado para su publicación en la revista Molecular Microbiology. En esta sección se hacen algunos comentarios que no se mencionan en el artículo, y se presenta un análisis de la estrategia experimental desarrollada en este trabajo.

Como se mencionó en la introducción, el hecho de que los genes de RNA ribosomal de *E. histolytica* se encuentren localizados en un episoma y que el núcleo de la amiba no contenga una organización cromatínica nucleolar típica nos fue sumamente interesante. Por lo tanto decidimos localizar la posición del episoma en el núcleo del trofozoito. Para lograr esto se utilizó una clona genómica aislada en nuestro laboratorio por el M. en C. Jorge Cruz. Estudios de secuenciación realizados por J. Cruz mostraron que esta clona de aproximadamente 150 pb era idéntica a la reportada por el grupo de Mirelman llamada p145 (Fig. 3). Se conoce que este DNA está presente varias veces en el episoma ribosomal y que no es transcrito. Por lo tanto el elemento p145 es ideal para ser utilizado como sonda en experimentos de hibridaciones DNA-DNA *in situ*, ya que su alto número de copias facilita su detección y solo hibrida con DNA episomal y no contra RNA. Además, cabe mencionar que las condiciones de hibridación contra DNA y RNA *in situ* son diferentes. A pesar de ser una estrategia simple, se pudo obtener información relevante la cual es presentada en el artículo anexo y los resultados analizados en más detalle en la discusión. Creo que es importante señalar que este es el primer reporte en el que se utiliza esta técnica en *E. histolytica*; la metodología se describe en el artículo anexo.

Los resultados de hibridación *in situ* nos mostraron que el episoma ribosomal y por lo tanto los genes de RNA ribosomal se encuentran localizados de manera preferente en la periferia de la membrana nuclear interna. Esto es observado durante todo el ciclo celular del trofozoito ya que durante la división celular de una amiba la membrana nuclear no se desensambla y aún en este estadio el episoma fué localizado en la periferia de la membrana nuclear.

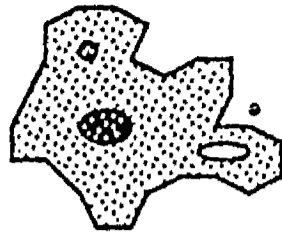
Estos resultados eran esperados dado de que Albach en 1982 reportó que la periferia de la membrana nuclear interna, es altamente rica en RNA y que por lo tanto tal región era un buen candidato para ser el nucleólo de *E. histolytica*. Sin embargo el haber identificado que el episoma ribosomal se encuentra en esta región que es rica en cromatina (ver introducción), es la prueba directa de que el rDNA es un componente importante de la cromatina periférica. Esta información nos dió la oportunidad de plantearnos nuevas preguntas.

Ya que el episoma ribosomal es un componente de la cromatina periférica sugiere que este DNA se encuentra en contacto directo con proteínas que lo mantienen en dicha región nuclear. Por lo tanto se decidió explorar la organización de la cromatina del episoma ribosomal. Inicialmente se trató de realizar experimentos típicos de digestiones con nucleasa micrococcal y DNAasa I, esperando encontrar un patrón típico de digestión nucleosomal. Sin embargo, después de varios intentos no fué posible encontrar un resultado claro. Recientemente, Torres et al. (en prensa) ha reportado que la cromatina de *E. histolytica* no presenta una organización similar a la encontrada en otros eucariotes, parece haber algo similar a nucleosomas, pero más dispersos.

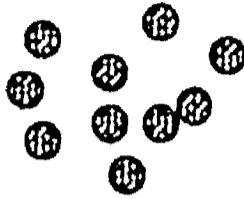
Ya que no fué posible concluir nada de nuestros experimentos con nucleasas, lo que se decidió hacer fué utilizar una técnica sumamente ingeniosa desarrollada por Hutchinson y Weintraub (1985). Esta metodología, conocida como *in situ* "nick translation" permite obtener información directa del estado de la cromatina en regiones específicas y la adaptamos para ser utilizada en *E. histolytica*. En general los núcleos de la amiba son purificados e incubados en un buffer en presencia de DNAasa I, DNA polimerasa I y los cuatro deoxinucleótidos, uno o dos de ellos radioactivos. Bajo estas condiciones la DNAasa I puede realizar mellas en el DNA en regiones donde es accesible en la cromatina y entonces la DNA polimerasa incorpora los nucleótidos radiactivos en estas regiones (Fig 4). El DNA marcado es purificado de los núcleos y utilizado como sonda en experimentos tipo "Southern" contra diferentes clonas del episoma ribosomal o contra digestiones de DNA total de la amiba. Las bandas que hibridan con la sonda contienen aquellas regiones que son sensibles a DNAasa I. Estos resultados son mostrados en el artículo anexo. Encontramos que las regiones del episoma que contienen los extremos 5' así como 3' del cistron ribosomal fueron sensibles a DNAasa I. Interesantemente las regiones en donde se encuentra localizado el elemento repetido de 145 pb fueron altamente marcadas. El hecho de que los extremos del cistron ribosomal sean sensibles a DNAasa I ha sido observado también en otros sistemas. Por otra parte, la cantidad de incorporación en regiones que contienen el elemento de 145 pb sugiere diferentes posibilidades: 1) que en dicho DNA puedan existir segmentos con mellas que facilitan la iniciación de polimerización; 2) que la mayor incorporación de marca sea un reflejo de el alto número de copias del elemento repetido; ó 3) que en estas regiones de DNA la estructura de la cromatina es diferente debido a la asociación de factores específicos.

Los experimentos de marcaje *in situ* incrementaron el interés por la secuencia repetida de 145 pb debido a que existía la posibilidad de que este DNA fuera reconocido de manera específica por algún factor nuclear y que por lo tanto este elemento tenga una función en el episoma

NICK TRANSLATION "IN SITU"



PURIFICACION DE NUCLEOS



INCUBACION CON
DNase I + Klenow+ dNTP's*
POR 15 MINUTOS

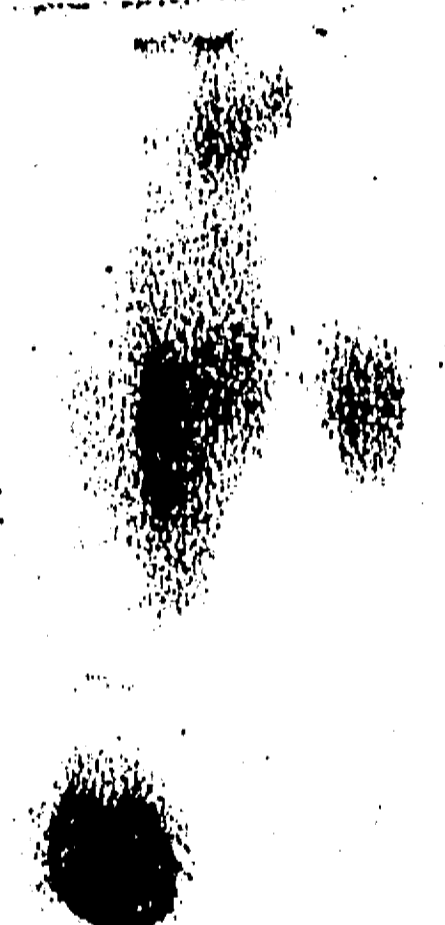
PURIFICACION DEL DNA MARCADO
(PREFERENCIALMENTE REGIONES HIPERSENSIBLES A DNaseI
EN LA CROMATINA)

HIBRIDACION CONTRA DIFERENTES CLONAS DEL EPISOMA
O CONTRA DIGESTIONES DE DNA TOTAL DE AMIBA

ribosomal. Con el fin de explorar esta posibilidad se llevaron a cabo experimentos de interacción Proteína-DNA conocidos como geles de retardamiento (Strauss and Varshafsky, 1984). Para montar esta técnica se usaron extractos nucleares de *E. histolytica* y el elemento de 145 pb (Fig 5). Los extractos nucleares fueron preparados de manera semejante a extractos provenientes de células de mamífero (Strauss and Varshafsky, 1984). Se encontró que nuestras preparaciones tenían la capacidad de interaccionar con el elemento de 145 pb, provocando un retardamiento de aquellos fragmentos de DNA que lo contiene, lo cual mostró que sí existía alguna actividad de unión específica, y que esta estaba presente en nuestras preparaciones. El experimento que mostró una interacción específica del elemento de 145 bp con uno o varios factores nucleares se muestra en la figura 3 del artículo. Este experimento consistió en incubar a la secuencia p145 con extractos nucleares en presencia de concentraciones crecientes de DNA de esperma de arenque. Paralelamente un DNA de similar tamaño no relacionado en las mismas condiciones se usó como control. Los resultados mostraron que aún en presencia de 1600 veces más DNA competidor, un complejo que probablemente es proteína-DNA está presente. Sin embargo, el DNA no relacionado no forma ningún complejo con sólo 100 veces de DNA competidor. Este experimento es muy semejante al reportado por Strauss y Varshavsky (1984), en el que un DNA repetido de humano conocido como secuencia A interacciona con una proteína perteneciente a la familia HMG ("high mobility group") de manera específica. Estos datos fueron apoyados por experimentos tipo "footprinting" en los que observamos que una región de aproximadamente 40 pb que es protegida de forma parcial, así como un dominio más pequeño, dentro de esta región que muestra una mayor protección. Estos experimentos se muestran en el artículo anexo. Dado que la señal obtenida en los experimentos de footprinting es algo marginal (aunque también ocurre cuando se utilizan extractos nucleares crudos en otros sistemas), decidimos corroborar este resultado. Para lograrlo se diseñó un oligonucleótido sintético que contiene la región de DNA que se observa con mayor protección en los diferentes experimentos de footprinting, y se probó si este DNA era capaz de ser reconocido de manera específica por los extractos nucleares de *E. histolytica*. Se demostró que esta secuencia de DNA es suficiente para ser reconocida de manera específica por uno o varios factores nucleares de la amiba.

Hasta este punto del trabajo, habíamos determinado que a) el episoma ribosomal se encuentra localizado en la cromatina periférica del núcleo de la amiba, b) que existen diferentes regiones de sensibilidad a DNasa I en el rDNA y c) que el elemento repetido de 145 pb parece

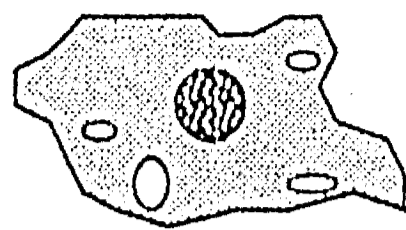
1 2 3 4



I

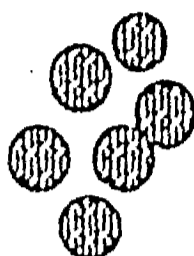
II

interaccionar con algún o algunos factores nucleares de manera específica. En base a estos datos, la identificación y caracterización de estos factores es sumamente atractiva, ya que existe la posibilidad de que pueda dar información acerca de los mecanismos de transcripción y/o replicación del episoma, además de identificar nuevos componentes de la cromatina periférica. Con el objetivo de iniciar la búsqueda del factor o los factores que pudiesen interaccionar con el elemento p145, se decidió adaptar la técnica de geles de retardamiento de manera preparativa. Esta técnica hasta donde tenemos información nunca había sido utilizada de esta forma. Esto se debe principalmente a que los complejos específicos proteína-DNA pueden comigrar con otras proteínas que son arrastradas en el gel, especialmente proteínas que se unen al DNA competidor de manera inespecífica o aquellas cuya carga neta sea muy negativa. Sin embargo, las proteínas unidas al DNA siempre migran más rápido que las que no se unen a éste, porque la principal carga está aportada por el ácido nucleico. Por lo tanto para contender con este problema utilizamos DNA competidor de alto peso molecular (~1000-5000 pb), al cual se unen la mayoría de las proteínas no específicas y por lo tanto estos complejos se quedan en la parte superior del gel. Un esquema de la estrategia utilizada es presentado en la figura 6. En el gel preparativo utilizamos extractos nucleares incubados con la secuencia p145 en presencia de 200 veces en exceso de DNA no específico, bajo estas condiciones el complejo específico DNA-proteína es identificado. El complejo fue eluido del gel y las moléculas resultantes analizadas en geles de poliacrilamida-SDS en un aparato PhastSystem (Pharmacia), que nos permite visualizar en un gel hasta 0.5 ng de proteína. La figura 5 del artículo muestra los resultados obtenidos los cuales son resumidos a continuación. Inicialmente se encontró que una proteína de aproximadamente 14 Kd fue el producto más abundante. Dos bandas adicionales también fueron visualizadas, una de ~28 Kd y otra de mayor peso molecular que parece ser el DNA eluido, ya que puede ser teñido con bromuro de etidio. Con el objetivo de ver si esta preparación contenía a los factores que se unen al elemento de 145 pb, la muestra fue renaturalizada parcialmente por medio de dialisis, concentrada y utilizada nuevamente en experimentos de interacción proteína-DNA. Se encontró que el material recuperado del gel mantiene las propiedades de unir específicamente al elemento de 145 pb, y no así un DNA control (Figura 6 del artículo). En este punto teníamos dos candidatos que podían ser él o los factores que interaccionan con el elemento repetido p145. El nuevo complejo obtenido con la preparación eluida del gel preparativo fue cortado del gel, eluido y analizado de nueva cuenta en el PhastSystem. El resultado fue que la proteína de 28 Kd es ahora el componente principal y que la banda de 14 Kd, casi no es observada. Esto ha sido reproducido en dos

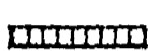


E. HISTOLYTICA

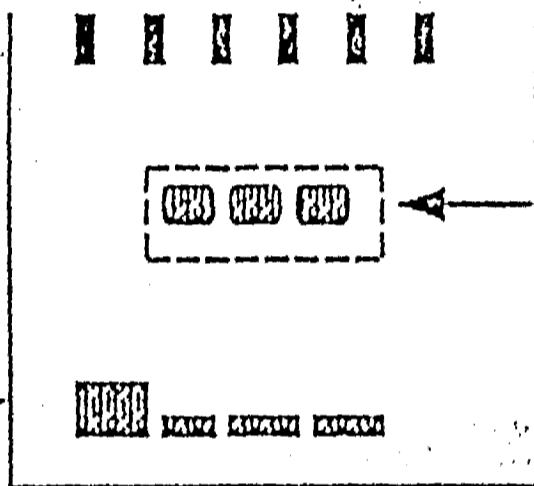
NUCLEOS



DNA (145 bp ELEMENT)



GEL DE RETARDAMIENTO



LA BANDA RETARDADA

ES CORTADA

CONTROL



ELUCION EN UN BUFFER CON SDS Y
2-BME.



CONCENTRADA

ocasiones sugiriendo fuertemente que el principal componente que interacciona con el elemento repetido de 145 pb es un polipéptido de aproximadamente 28 Kd.

DISCUSION:

En el presente trabajo, utilizando técnicas simples de biología molecular ha sido posible iniciar estudios sobre la organización del genoma de *E. histolytica*, utilizando como modelo al episoma ribosomal. A continuación se discuten los diferentes resultados.

Localización nuclear del episoma ribosomal.

La organización de la cromatina en el núcleo eucariote ha sido un tema fascinante de investigación. Recientemente ha sido posible estudiar la localización específica de regiones del genoma dentro del núcleo. Para esto se han utilizado la microscopía electrónica, la microscopía óptica y sus variantes, para la detección *in situ* de ácidos nucleicos y proteínas. Así pues se ha determinado que secuencias específicas de DNA no se encuentran en una posición al azar dentro del núcleo, sino que dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula estas mantienen una posición determinada. Por ejemplo la localización de ciertos genes en células de mamífero depende del tipo celular y de que estos se estén expresando o no (Agard and Sedat, 1983). También ha sido observado que el complejo de ribonucleoproteínas que componen al "esplisoma" no se encuentra disperso, sino que mantiene posiciones específicas dentro del núcleo (Fu and Maniatis, 1990). En *Trypanosoma cruzi* utilizando microscopía confocal e hibridaciones *in situ* se pudo determinar que las secuencias teloméricas se encuentran unidas a la membrana nuclear (Chung et al. 1990). Como se mencionó en la introducción, el núcleo de *E. histolytica* posee características diferentes a las de otros eucariotes, siendo tal vez las más importantes la ausencia de un nucleólo típico y la presencia de la cromatina periférica. En este trabajo utilizando hibridaciones *in situ* y microscopía óptica se presenta evidencia de que el episoma ribosomal de *E. histolytica* se mantiene de manera preferencial en la membrana nuclear interna durante todo el ciclo celular del trofozoito, y que al parecer el episoma es un componente importante de la llamada cromatina periférica. Hasta el momento no es posible descartar la presencia de copias de los genes ribosomales en lugares diferentes al de la cromatina periférica, pero todo parece indicar que la mayoría de ellas se encuentran localizadas en la periferia del núcleo. El hecho de que el episoma ribosomal sea un componente de la cromatina periférica sugiere que la transcripción y la replicación de este DNA ocurre en dicha región nuclear, pudiéndose

considerar a este DNA extracromosomal como un organizador nucleolar. Esto es apoyado por experimentos previos que muestran que la cromatina periférica es altamente rica en RNA (Albach, 1980), como ocurre en el nucleólo de otros organismos.

Otro aspecto interesante que pudo ser observado de estos estudios es que el episoma se mantiene en la periferia del núcleo durante su división. En la división celular del trofozoito la membrana nuclear nunca es disuelta, el núcleo sólo aumenta en tamaño y se divide generando dos núcleos hijos. En ocasiones esto puede ocurrir sin citoquinesis, de tal forma que es común encontrar amibas que contienen mas de un núcleo. Con simples técnicas de tinción se ha observado que la cromatina periférica se mantiene durante el ciclo celular del trofozoito e incluso en el quiste (Martínez-Palomo, 1982). Esto sugiere que el episoma ribosomal debe de estar en contacto con proteínas específicas que lo mantienen anclado o unido en dicha región nuclear, como un modo que asegura la segregación del plásmido durante el ciclo celular.

Mapa de sensibilidad a la DNAasa I del episoma ribosomal.

Si consideramos que la cromatina periférica es la contraparte del nucleólo, en dicha región nuclear debieran estar presentes otros componentes típicos de el nucleólo como son factores que intervienen en la transcripción y procesamiento de los genes de RNA ribosomal. En este caso particular proteínas que intervienen en la replicación del episoma, topoisomerasas que relajen o enrollen al plásmido, componentes fibrilares, etc. Por lo tanto, un análisis más detallado de la organización de la cromatina periférica es útil para identificar regiones de contacto entre proteínas y DNA. De esta forma sería posible identificar otros componentes de la cromatina periférica adicionales al episoma. Con este propósito nuestra estrategia consistió en determinar las regiones de sensibilidad a DNAasa I utilizando el sistema de "nick translation" *in situ*. Generalmente los extremos 5' de cualquier gen que es altamente transcrito, mantienen una cromatina relajada como consecuencia de la presencia persistente de la maquinaria transcripcional en esa región. Se encontró que los extremos 5' así como el 3' del cistrón ribosomal mantienen cierto grado de sensibilidad a nucleasas. Este resultado ha sido reportado anteriormente en algunos cistrones ribosomales (Sollner-Webb and Tower, 1986). Lo que si fué de cierta forma inesperado, es que aquellas regiones de DNA que contienen al elemento repetido de 145 pb fueron eficientemente marcadas durante el "nick translation" *in situ*. Esto sugirió que la región del episoma en la cromatina periférica en la que se encuentra el elemento de 145 pb presenta una conformación diferente al resto de la

molécula que puede ser ocasionada por diferentes razones. La más atractiva es que dicha región sea el sitio de contacto con algún factor específico que intervenga en alguna de las funciones del episoma ribosomal. Así mismo datos de nuestro laboratorio han mostrado que el elemento repetido de 145 pb no siempre está en tandem y que el número de copias así como la secuencia es inestable, y solo se mantienen conservados algunos subdominios del elemento (Esteves et al. 1991). Esto sugiere que hay una frecuencia muy alta de recombinación entre dichas regiones, y es importante tener presente que estas secuencias dentro del episoma pueden ser puntos de recombinación o relajamiento.

Interacciones DNA proteína que incluyen al elemento de 145 pb.

A partir de los datos obtenidos con los experimentos de nick translation *in situ*, se decidió probar si el elemento repetido de 145 pb interactuaba con factores nucleares. Ha sido reportado en otros sistemas que en las regiones intergénicas de los genes ribosomales se encuentran secuencias repetidas en tandem que funcionan como "enhancers" transcripcionales. Estos elementos trabajan a través de la interacción con factores nucleares específicos que aún no han sido completamente caracterizados, pero que sin lugar a dudas juegan un papel importante en la expresión de los genes de RNA ribosomal. La región de DNA que contiene al elemento de 145 pb se encuentra localizada en el episoma ribosomal hacia el extremo 5' (aproximadamente a 3000 pb del inicio de la transcripción, (Michel y Zurita datos no publicados) y al final del cistron ribosomal en el extremo 3'. En nuestro caso la distancia del elemento repetido con respecto al promotor es mayor que la presente en otros sistemas. Puesto que se han identificado secuencias repetidas de DNA como sitios de inicio de la replicación se decidió explorar la posibilidad de interacción de este DNA con factores nucleares.

Utilizando geles de retardamiento y experimentos de "footprinting", encontramos que existe al menos un factor nuclear que interactúa de manera específica con el elemento repetido de 145 pb. En el caso de los geles de retardamiento es posible observar dos complejos, el complejo que migra más rápido en el gel, parece ser el más estable. Estos dos complejos podrían representar la interacción de dos moléculas con el elemento repetido de 145 pb, o en el caso del complejo que migra menos en el gel, una interacción inespecífica con otra molécula. Estas dos opciones pudieran explicar nuestros experimentos de "footprinting" en los que se observa una protección de alrededor de 40 pb, dentro de las cuales hay una región de 8 pb en la que existe mayor contacto entre la proteína y el DNA. Esto fue corroborado a partir del uso de un oligonucleótido sintético de doble cadena que contiene los 8 pb que

aparentemente son más protegidas (ver resultados en el artículo). En base ha estos resultados podemos decir que la secuencia de DNA contenida en el oligonucleótido es suficiente para ser reconocida de forma específica por un factor nuclear de *E. histolytica*. La pregunta ahora es: Que función tiene dicha secuencia de DNA y cuál es el papel de la(s) proteína(s) que interaccionan con ella?. Para poder contestar esta pregunta se requiere de metodología que aún no ha sido implementada en *E. histolytica*, como sería genética y transformación con DNA exógeno. Sin embargo la caracterización física de él o los factores nucleares que interaccionan con el elemento repetido de 145 pb será util, ya que al menos permitirá conocer qué tipo de proteína(s) que interacciona(n) con este DNA y tal vez a partir de conocer la secuencia de la proteína, poder inferir su función.

En la etapa inicial de la caracterización de los factores nucleares que interaccionan con el elemento repetido de 145 pb, encontramos que el mejor candidato es una proteína de alrededor de 28 kDa. Aún no podemos descartar que el material que migra con el frente de nuestras preparaciones esté involucrado en la interacción con el elemento de 145 pb, o que incluso algo que no podemos identificar en el gel sea lo que se está uniendo de manera específica al DNA. Sin embargo, el hecho de que después del segundo gel preparativo la proteína de 28 kDa se enriquece con respecto al material que migra con el frente del gel y que la cantidad de proteína que observamos coincide con la de DNA presente en el complejo, el polipéptido de 28 kDa sigue siendo el mejor candidato.

Podemos especular mucho acerca de la posible función de la(s) proteína(s) que interaccionan con el elemento de 145pb. Por ejemplo podría estar involucrado en los mecanismos de transcripción de los genes ribosomales, en la replicación del episoma, formando parte de un complejo con la membrana nuclear interna como un mecanismo de estabilidad del plásmido o simplemente determinando una conformación diferente de la cromatina en dicha región. En este momento aún no conocemos la respuesta, pero cualquiera que esta sea aportará información relevante sobre la organización y regulación del episoma ribosomal de *E. histolytica*.

La estrategia en un futuro consistirá en realizar una purificación preparativa utilizando sistemas de afinidad con el oligonucleótido sintético y a partir de esto se tratará de secuenciar parte de la proteína para poder diseñar sondas y clonar el gen correspondiente. Esto permitirá deducir la secuencia primaria de la proteína y establecer homologías con secuencias transformadas. Por otro lado sería muy interesante cuando exista un sistema de transformación tratar de inactivar el gen.

Otra posibilidad para conocer la posible función del elemento repetido de 145 pb es utilizar el sistema diseñado por Bielinska et al. (1990), en el que, un tio-oligonucleótido doble cadena que contenga la secuencia blanco de la proteína, sea introducido en el parásito, de tal forma de que éste compita con el sitio de unión, esperando observar un fenotipo en la amiba. En este caso en particular el hecho de que el episoma se encuentra entre 200 a 300 copias por núcleo indica la existencia de muchos sitios blancos, por lo que es poco factible que pudiera competir eficientemente con el uso de un oligo específico.

En conclusión creo que hemos dado un paso importante durante esta etapa inicial, utilizando al episoma ribosomal de *E. histolytica* como un modelo de estudio de la organización y expresión genética en la amiba.

Referencias.

Agard, D.A and Sedat, J.W (1983) Three dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature*, 302, 676-681.

Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. and Downing, S. (1980) Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigacion Médica (México)*. 11, Suppl. 1, 63-74.

Aley, S.B., Scott, W.A and Cohn, Z.a. (1980) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *Jexp. Med.* 152: 391-404.

Bell, S.P., Pikaard, C.S., Reeder, R.H. and Tjian, R. (1989) Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell*, 59, 489-497.

Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond L.S., Soldo, A.T. (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool*, 36, 455-458.

Bialinska, A. Shivdasani, R.A., Zhang, L. and Nabel, G.J. (1990) Regulation of gene expression with double stranded phosphorothiate oligonucleotides. *Science*, 250: 997-999.

Blake, M.C. and Azizkhan J. C. (1989) Transcription factor required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol.*, 9, 4994-5002.

Calderón, J., Muñoz, M. L. and acosta H.M. (1980) Surface redistribution of antibody-induced caps in Entamoeba. J. Exp. Med. 151: 184-193

Cerbón, J. and Flores, J. (1981) Phospholipid composition and turnover of pathogenic amebas. Comp Biochem. Physiol. 69: 484-492.

Dover, G.A. and Flavell R.B. (1984) Molecular coevolution: DNA divergence and maintenance of function. Cell, 38: 622-623.

Donaway, M. (1989) A transcription factor, TFIS interacts with both promoter and enhancer of rRNA genes. Genes Dev. 3: 1768-1778.

Financsek, I., Mizumoto, Y., Mishima and Muramatzu, M. (1982) Human ribosomal ribosomal RNA gene: Nucleotide sequence of the transcription initiation region and comparison of three mammalian genes. Proc. Natl. acad. Sci. USA 79:3092-3096.

Federoff, N.V. (1979) Cell 16: 697-710.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1982) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem, 132, 6-13.

Fox, K.R. and Waring, M. J. (1984) DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin revealed by DNAase I foot-printing. Nucl Acid Res, 12, 9271-9285.

Fu, X. and Maniatis, T. (1990) Factor required for mammalian spliceosome is localized to discrete regions in the nucleus. Nature, 343, 437-441

Garfinkel, L.I., Giladi, M., Huber, M., Giller, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S. (1989) DNA probes specific for Entamoeba histolytica possessing pathogenic and non-pathogenic zymodemes. Infect. and Immun, 57, 926-931.

Gunderson, J.H. Sogin, M.L. Wollett, G., Hollingdale, M., De la Cruz, U. T. Waters, A.P. and McCutchan T. F. (1987) Science, 238: 933-932.

Grummt, J.B., Roth, E. and Paule (1982) Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. *Nature* 296: 173-174.

Huber, M., Koller, B. Gitler C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S., and Garfinkel, L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol*, 32, 285-296.

Hui-Min M.C, Shea C, Scott F. Taub, R.N. and Van der Ploeg L.H.T. (1990) Architectural organization in the interphase Nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of the telomers. *The EMBO Journal* , 9, 2611-2619.

Hutchinson, N., and Weintraub, H. (1985) Localization of DNAase I sensitive sequences to specific regions of the interphase nuclei. *Cell*, 43, 471-482.

Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P. and Tjian, R. (1990) Nucleolar transcription factor hBUF contains a DNA binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, 344: 830-836.

Lawrence, J.B., Singer., R.H. and Marselle (1989) Highly localized tracts of specific transcripts within interphase nuclei visualized by in situ hybridization. *Cell.*, 57, 493-502

Long-Krug, S.A., Fisher, K. J. and Radvin J.I. (1985) Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localizatio. *J. Infect. Dis.* 152: 536-541.

Martinez-Palomo, A. (1982) *The Biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press/Wiley, Chinster, 269 pp.

Martinez-Palomo, A. (1986) *Biology of Entamoeba histolytica*. In "Amebiasis". A. Martinez-Palomo (Ed.) Vol. 2, Human Parasitic Diseases. Elsevier. Amsterdam. pp. 11-43.

MacCaul, T. F. Poston, R.N. and Bird R.G. (1977) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*: Chromium release from labeled human liver cells in culture. *Exp. Parasitol.* 43: 342-353.

Mithcell, P.J and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.

Onishi, T.C., Berglund, C. and Reeder, R.H. (1984) On the mechanism of nucleolar dominance in mouse- human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Scic.* 81: 484-487.

Pape, L.K. Windel, J. and Sollner-Webb. (1990) Half helical turn spacing changes convert a frog into a mouse rDNA promoter: A distant upstream domain determinates sthe helix face of the initiation site. *Genes and Dev.* 4: 52-62.

Pikkard, C.S., McStay, B., Shultz M.C., Bell, S.P., and , R.H. (1989) The *Xenopus* ribosomal gene enhancers bind and essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes and Dev.* 3: 1779-1788.

Pinto da Silava, P., Marteinez-Palomo, A. and González-robles, A. (1975) Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. *Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate.* *J. Cell Biol.* 64: 538-550.

Ravdin, I.J. (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins and contact- dependent cytolysis. *Rev. Inf. Dis.* 8: 247-260.

Ravdin, I.J. (1989) *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J infect. Dis.* 159: 420-429.

Ravdin I.J., murphy. C.F. Guerrant, R.L. and Long-Krug, S.A. (1985) Effect of calcium and phospholipase A antagonist in the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infec. Dis.* 152: 542-549.

Reeder, R.H. (1990) rRNA synthesis in the nucleolus, *Trens in Genetics.* 16: 390-395.

Samuelson, J., Acuña-Soto, R., Reed, S., Biagi, F. and Wirth, D. (1989) DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.,* 27, 671-676.

Said-Fernandez, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza J., Mata-Cardenaz, B., Navarro-Montejo, L., Garza-Lozano, G., and Martinez-Rodriguez, H. (1988). PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. of Royal Soc. Trop Med and Hyg*, 82, 249-253.

Sargeunt, P.G., Williams, J.E. and Neal, R.E. (1980) A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9, etc.) " *Trans Royal Soc Trop. Med and Hyg* , 74, 469-474.

Sepulveda , B. & Matínez-Palomo, A. (1984) Amebiasis. En *Tropical and Geographical Medicine*, K.S. Warren & A. A. Mahamoud (Eds) McGraw-Hill, N.Y., pp 305-318.

Spencer, D.F., Collings, J.C., Schanare, M. and Gray, W. (1987) *EMBO J.* 6: 1063-1071.

Solner-Webb, B. and Tower, J. (1986) Transcription of clones eucaryotic ribosomal RNA genes . *Ann. Rev. Biochem*, 55, 801-830.

Serrano, R., Deas, J.E. and Warren, L.G. (1977). *Entamoeba histolytica*: membrane fractions. *Exp Par.* 41: 370-384.

Strauss F., and Varshavsky, A. (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell*, 37, 899-901

Stat, D.A. (1980) *Biotechnology* 4:623-628.

Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J. and Arnold, H.H. (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 5118-5122.

THE *E. histolytica* rDNA EPISOME: NUCLEAR LOCALIZATION, DNAase I SENSITIVITY MAP AND SPECIFIC DNA-PROTEIN INTERACTIONS

Mario Zurita, Alejandro Alagón, Javier Vargas-Villarreal and Paul M. Lizardi*+

Department of Biochemistry, Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62271, Cuernavaca, Mor.,
México.

Tel.: (52)(73)172799,172999 FAX: (52-73) 172388.

*Corresponding author.

+Present address:

Department of Molecular Biology,
Wellman Bldg., 9th floor
Massachusetts General Hospital,
Boston, Massachusetts, 02114.
(617) 726-5978

ABSTRACT

Structural and functional features of the extrachromosomal DNA element, that contains the ribosomal RNA genes of *Entamoeba histolytica*, were studied using a variety of techniques. Using *in situ* hybridization, the element was found to be distributed along the inner phase of the nuclear membrane in the trophozoite stage, it appears to be part of the so-called peripheral chromatin. DNAase I - sensitive regions on the episome were mapped and found to correspond to the borders of the ribosomal RNA coding region. Other DNAase I - sensitive regions were found to correspond to DNA containing a 145 bp sequence that exists in the episome as tandem repeats. Electrophoretic shift assays and footprinting experiments demonstrate the existence of specific nuclear factors that bind specifically to the 145 base-pair repeat. Preliminary analysis of the binding factors showed that a 28 kDa polypeptide is a likely candidate for a specific DNA:protein interaction involving the repetitive element. These results suggest that a protein-binding domain within the 145 bp repeat may have a specific function in the episome.

INTRODUCTION

Entamoeba histolytica, the etiologic agent of human amebiasis, is considered to be a very primitive eukaryote. It lacks a structured cytoskeleton and cytoplasmic microtubules, a Golgi complex, endoplasmic reticulum, mitochondria and typical lysosomes (Martínez-Palomo, 1982; Martínez-Palomo, 1986). In fact, the only typical eukaryotic organelle found in *E. histolytica* is the nucleus, but very little is known about its structural organization. The nuclear components of this parasite have a distribution different from the usual nuclear configuration of most eukaryotic cells. A small spherical mass, of around 0.5 μm in diameter, is located near the center of the nucleoplasm. The so-called peripheral chromatin is present all-round the internal nuclear membrane and is rich in RNA (Martínez-Palomo, 1982.; Albach *et al.* 1980). It has been proposed that the peripheral chromatin is the counterpart of the eukaryotic nucleolus (Albach *et al.* 1980).

Recently it was reported that the ribosomal RNA genes (rDNA) of *E. histolytica* are located in a circular extrachromosomal molecule of 24.5 kb (Bhattacharya, *et al.* 1989 ; Huber *et al.* 1989). Although the possible presence of chromosomal copies of the ribosomal RNA genes has not been ruled out, the episome, which is present in 200 copies per cell, is the principal depository of these genes. Each episome contains two copies of the ribosomal genes, and several copies of a repetitive DNA element of unknown function. As in the ribosomal genes of other species (Solner-Webb and Tower, 1986), the repetitive element occurs as tandem repeats in spacer regions. A striking feature of this repetitive element is its variation among different strains (clonal isolates) of *E. histolytica* (Huber *et al.* 1989). Strains of so-called "pathogenic" zymodeme contain 145 base-pair repeats, while strains of "non-pathogenic" zymodeme contain a different type of repeat of 133 base-pairs (Garfinkel *et al.* 1989; Samuelson *et al.* 1989). Garfinkel *et al.* (1989) have reported that when an *E. histolytica* clone of "pathogenic" zymodeme is incubated in axenic media, the zymodeme pattern changes to "non-pathogenic" and, furthermore, that this conversion can be reverted if the culture is again propagated in monoaxenic media. In parallel with the zymodeme conversion, they observed a corresponding change in the type of ribosomal episome repeat sequence. The conversion hypothesis of Garfinkel *et al.* would imply the existence in all cells of master copies of the ribosomal genes containing either type of repeat. However, it is difficult to reconcile the conversion hypothesis with the data of Tannich *et*

al. (1989), who found significant differences in the sequence and genomic organization of structural genes of different isolates of *E. histolytica*. Their results suggest that amoebas of "pathogenic" and "non-pathogenic" zymodeme may be different species.

Aside from the ongoing controversy regarding species versus convertible strains, it seems clear that episomes carrying 145 bp repeats harbor the functional ribosomal genes in amoebas of the so-called "pathogenic" zymodeme. Other observations suggest that *E. histolytica* rDNA episomes are autonomously replicating elements (Bhattacharya et al. 1989). We have thus set out to study the structural and functional organization of the episome, because it is of interest from the point of view of eukaryotic nucleus evolution and, additionally, because knowledge about this autonomously replicating element may be useful in future efforts toward the construction of DNA vectors for stable genetic transformation of *E. histolytica*.

In this report we have used *in situ* hybridization to map the cytological location of the rDNA episome in *E. histolytica*. We have mapped the DNAase I-sensitive regions of the episome and found that some of these domains reside in the 145 base-pair repetitive element. In addition, we have shown that this repetitive DNA is in contact with specific nuclear factors, suggesting that it may play a role in episome function.

Experimental Procedures

Materials.

E. histolytica strains HK9 and HM1, both characterized as having a "pathogenic" zymodeme (Said-Fernández *et al.* 1988; Sargeant *et al.* 1980), were grown in PEHPS media (Said-Fernández *et al.* 1988). Other materials were obtained from the following sources: restriction enzymes, from Promega and New England Biolabs; DNAase I, from Boehringer Mannheim; radiolabeled nucleotides, from New England Nuclear. Standard DNA manipulations were performed according to protocols of Maniatis *et al.* (1982).

In situ hybridization.

E. histolytica cells were fixed for 5 min in 2% paraformaldehyde, rinsed in 2 times in PBS and dehydrated with ethanol. After heating the slides for 10 minutes at 70°C in 70% formamide, the cells were prehybridized in 1X Denhardt's, 4X SSC (1 X = 0.06M Na citrate, 0.6M NaCl), 50% formamide, 0.05% tRNA, 10mM Tris-HCl, [pH 7.5]. The slides were incubated for 2 hr, washed for 2 minutes in 2X SSC and incubated overnight in the presence of the probe (6X10⁶ cpm per slide) in the above hybridization solution containing 10% dextran sulphate at 42°C. Hybridization was performed using either [³²P] or [³⁵S] random-primed probes of the 145 bp repetitive DNA element. Slides were drained in 2X SSC plus 0.1% Pirophosphate, and washed three times for 20 min in 0.5X SSC at 42°C. The NTB-2 emulsion used to coat the slides for autoradiography was exposed for 1-7 days at 4°C. Cell morphology was visualized using phase contrast microscopy, whereas the silver grains were visualized under bright field illumination.

In situ nick translation.

Isolated *E. histolytica* nuclei were incubated in nick translation buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 7.8; 5 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol and 10 µg/ml of BSA), in the presence of 5mM dNTP's (dATP, dGTP and dTTP) plus either 150 µCi of [^α-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), or 250 µCi [^α-³²P] of dCTP plus 150 µCi [^α-³²P] of dATP (1000 Ci/mmol), 0.5 units of DNAase I and 5 units of DNA polymerase I. After 15 minutes of incubation at 25°C the DNA was purified

from the nuclei by phenol-chloroform extraction and used as hybridization probe (Hutchinson and Weintraub 1985).

Electrophoresis shift assay and footprinting

E. histolytica were collected by centrifugation, washed once with PBS and resuspended in 3 volumes of 0.25 M sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.25mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM spermidine, 14 mM 2-mercaptoethanol, 15 mM Tris-HCl [pH 7.4] and 0.5 mg of p-chloromercuribenzoic acid. The cells were disrupted in a manual (Dounce) homogenizer (~20 strokes); phase-contrast microscopy was used to determine the optimal number of strokes. The lysate was layered onto a 9 ml cushion of 1M sucrose, and centrifuged at 7000 rpm for 10 min. at 4°C. The nuclei were then either used immediately or stored at -70 °C. The [³²P] 145 bp DNA element or a synthetic double stranded oligonucleotide, unlabeled herring sperm DNA competitor, and nuclei were mixed in 25 µl of 0.1% Triton X-100, 4% glycerol, 1mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl [pH7.5] and 40mM NaCl; nuclear preparation (1-4 µl) was added last. The mixture was incubated for 30 min at room temperature and thereafter loaded onto a low-ionic strength 4% polyacrylamide gel as previously reported (Strauss and Varshavsky, 1984). The gel was then dried and subjected to autoradiography. For DNAase I footprinting experiments, a 180 bp *EcoRI-HindIII* fragment that contains a 145 bp repetitive unit was incubated with increasing amounts of nuclear preparations (0,1,2,3 and 4 µg of total protein) in the presence of herring sperm DNA (800ng); upon which 0.3 units of DNAase I were added. The reaction was stopped by the addition of 0.1M EDTA and the sample was loaded on a preparative electrophoresis shift gel (Strauss and Varshavsky, 1984). The DNA:protein complex, as well as the free 180 bp band were isolated from the gel by electroelution, and separated in a sequencing gel.

Preparative shift gel and PhastSystem analysis

For the preparative shift gel, 10 ng of the [³²P] 145 bp DNA element and 2 µg of unlabeled sonicated herring sperm DNA were incubated with the nuclear extract (~10 µg of protein) and then loaded in a 4% preparative gel. After electrophoresis, the gel was subjected to autoradiography at 4°C for 30 min and a slice containing the radioactive complex was cut out and incubated overnight in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 2.5 % 2-

mercaptoethanol and 1 mM p-chloromercuribenzoic acid at 4°C. The eluted sample was concentrated to approximately 100 µl using a Centricon 10 column (Amicon Corp.); then 6 µl of the concentrated sample (dissolved in SDS) were then loaded on an SDS-12 % polyacrylamide gel and separated in a PhastSystem apparatus (Pharmacia); the proteins were visualized with silver staining. To renature unstained proteins, the concentrated sample was dialyzed against 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM NaCl and 1 mM p-chloromercuribenzoic acid at 4°C and then used directly for shift experiments.

RESULTS.

Nuclear localization of the rDNA episome

The presence of rDNA in a 24.5 kb episome, together with early reports of the absence of a typical nucleolus in *E. histolytica*, suggested that rDNA could be organized in an unusual fashion. To determine the nuclear localization of the rDNA episome, we used DNA-DNA *in situ* hybridization. We used as probe cloned DNA containing the 145 repetitive element. DNA sequencing confirmed that the sequence of our probe was identical to that previously reported by Huber, *et al.* (1989). Published data suggested that this DNA was not transcribed, thus it was expected to hybridize with rDNA and not with ribosomal RNA. Radioactively labeled probe was hybridized against *E. histolytica* cells fixed on glass slides (Fig. 1). As control, we used non-specific probes hybridized under the same conditions (Fig.1, A and B). In slides hybridized with the 145 bp probe, the grains were preferentially localized all-around the internal nuclear membrane (Fig. 1D, and E). The possibility that the probe was inaccessible to the nucleus seems to be out of question, since in phase contrast observations the hybridization signal corresponded exactly with the evident location of the peripheral chromatin, which is inside the nucleus (Fig 1D). Figure 1E shows an *E. histolytica* nucleus in the process of division. In this case, the hybridization grains are also around the nuclear membrane, showing that the rDNA episome remained localized in this nuclear region during the trophozoite cell cycle.

DNAase I sensitivity map of the rDNA episome

The specific molecular configuration of episome DNA could be relevant in understanding the function of this extrachromosomal element. A useful strategy to identify regions in which DNA is highly accessible to enzymes or factors is to map the sensitivity to DNAase I. We used the mapping method of *in situ* nick translation developed by Hutchinson and Weintraub (1985). *E. histolytica* nuclei were purified and then incubated in nick-translation buffer in the presence of DNAase I, DNA polymerase I, and the four dNTP's, one of them radioactively labeled. Under these conditions, DNAase I nicks the DNA only in regions in which chromatin is accessible and then DNA polymerase incorporates radioactive nucleotides at these sites. The DNA thus labeled was used as probe in Southern blots containing restriction fragments of cloned episome DNA or restriction enzyme digests of total *E. histolytica* DNA isolated from strains HMI and HK9 (Said-

Fernández *et al.* 1988; Sargeant *et al.* 1980). The bands that hybridized with the probes should contain those episome regions that are sensitive to DNAase I.

The right-hand panels in Figure 2A (lanes 7-12) show the hybridization pattern of *EcoRI-HindIII* digested DNA of different genomic clones that span almost the entire large subunit ribosomal RNA gene and also include segments downstream of the 3' of the RNA-coding region. These downstream fragments contain several copies of the 145 bp repetitive element. Lanes 11 and 12, which show no hybridization signal, contain two small *EcoRI* fragments that map in the middle and near the 5' of the large ribosomal RNA (fragments "e", "f", Fig. 2C). The fragments showing a hybridization signal (lanes 7-10) map at the 3' end of the large subunit ribosomal RNA (*EcoRI-HindIII* fragment labeled as "g", Fig. 2C) and also at a region that contains the 145 repetitive element (fragment "i", figure 2C). The right-hand panel in figure 2B (lanes 6-9) shows the hybridization pattern of total DNA digests from two different strains of *E. histolytica* (*EcoRI* lanes 6 and 8, *BglII* lanes 7 and 9). In this experiment four times more radioactivity was used by adding dATP [³²P] in addition to the dCTP label, since some episome regions (like the 145 bp element) are very AT rich. Hybridization was detected in the high molecular weight bands of *EcoRI* and *BglII*-digested material (fragments "a" and "h", figure 2C; note that fragment "a" has different size in the two strains), and in a *BglII* band of around 2kb that contains the 5' end of the rDNA cistron (fragment "b", Fig. 2C). No hybridization was detected in the three *EcoRI* fragments of around 1, 0.7 and 0.6. kb and the *BglII* fragment of around 2.7 kb (fragments "c", "d", "e" and "f"). All these non-hybridizing fragments are located in the middle part of the rDNA cistron. As control purified DNA was tested with DNAase I in order to know if specific regions were sensitive, however it was uniformly digested (data not shown).

These results (summarized in the diagram in figure 2C) demonstrate that the 5'-end and upstream flanking sequences of the RNA-coding region, as well as the 3' end and the downstream flanking region, containing 145 bp repetitive elements, are sensitive sites for DNAase I in episome chromatin. The presence of DNAase I sensitive sites in the rDNA cistron border is not an unexpected result, since similar nuclease susceptibility features have been reported in other systems (Solner-Webb and Tower, 1986; Bell *et al.* 1989). It is noteworthy, however, that those episome fragments that contain the 145 bp repetitive DNA element give a stronger signal compared to other DNA pieces (Fig. 2B).

DNA-protein interactions involving the 145 bp element.

Given that DNA regions containing the 145 bp repetitive element are specially sensitive to DNAase I, we investigated the possibility that this repetitive sequence may interact with specific nuclear factors. We performed electrophoresis shift assays, using a 180 bp *EcoRI-HindIII* restriction fragment that contains just over one repeat of the 145 bp element. The DNA fragment was incubated with nuclear extracts of *E. histolytica* (strain HK9) and challenged with increasing amounts of competing non-specific DNA to test the specificity of the protein-DNA interactions (Fig. 3A). As control, an unrelated restriction fragment of similar size was incubated under similar conditions with the nuclear preparation and with increasing amounts of non-specific DNA (Fig. 3B). The results showed that, in the absence of competing herring sperm DNA, two distinct complexes are formed between the 180 bp fragment and *E. histolytica* nuclear extract. When the amount of herring sperm DNA is increased, the slower-migrating complex (complex 1) disappears; however, the faster-migrating complex (complex 2) remains, even in the presence of a 1600-fold excess of non-specific DNA (Fig. 3A, lane 7). In the panel containing the labeled DNA fragment used as control, a shift band is observed in the absence of competing DNA (Fig. 3B, lane 2). However, this band disappears in the presence of only a 100-fold excess of competitor DNA (lane 4). These results were similar to the reported by Straus and Varshafsky (1984), using a repetitive element present in human cells, and suggest that the 145 repetitive sequence present in the rDNA episome interacts with specific nuclear factors. It is possible that more than one factor binds to this DNA, since two complexes could be identified, one of them (complex 2) with higher affinity.

In order to map the putative binding sites of the nuclear factors that interact with the 145 bp element, we performed DNA-footprinting experiments. Figure 4A shows an example of several experiments in which a region of about 40 bp is partially protected from DNAase I digestion; a shorter domain within this region (see figure) displays the strongest protection. When the amount of protein is increased, a few additional bands appear near the protected ones; this could reflect changes in DNA structure brought about by DNA binding factors (Blacke and Azizkhan 1989; Fox and Waring 1984,). The relatively large size of the protected region (40 bp) suggests that either more than one polypeptide binds to this region or that a fairly large protein is interacting with the DNA, having relatively stronger contact over a domain of about 8 bp.

In order to confirm the results obtained in the footprinting experiments, a 20 bp synthetic oligonucleotide (5'-GAAAATCAACGGTGTAATT-3'), containing the sequence region that displays the strongest protection, was used in shift gel experiments. Figure 4C, lane 2 shows that when the oligo is incubated with the nuclear extract a shift band was observed, however when this oligo was incubated in the presence of two or ten times excess of the same non labelled synthetic DNA, the shift band was not present (Figure 4C, lanes 3 and 5). In contrast, this competition did not occur when the oligo was incubated in the presence of non related 20-mer oligonucleotide (Figure 4C, lanes 4 and 6). These results shows that the protected DNA region observed in the footprinting experiments is sufficient for the specific recognition of nuclear factors present in the *E. histolytica* nucleus.

A protein of approximately 28 kDa interacts specifically with the 145 bp repetitive element

In order to identify the factor(s) that interact with the 145 bp element in the episome, we performed preparative shift gels. We used the same conditions as in Figure 3, in which a 180 bp DNA fragment was incubated with nuclear extracts in the presence of a 200-fold excess of nonspecific DNA. The complex was isolated by elution from gel slices, and a concentrated sample was denatured with SDS and analyzed by PhastSystem electrophoresis. Figure 5A shows that the most intensely stained material migrates with the front. Two additional bands were evident, a band of around 28 kDa and a high molecular weight band that probably corresponds to the 180 bp DNA fragment because it can be stained with ethidium bromide (not shown). The rest of the material obtained from the first preparative shift gel, was dialyzed in order to renature the proteins. The dialyzed proteins were incubated again with either the 180 bp DNA fragment or with a non-related DNA and re-analyzed in a shift gel. This protein preparation contains SDS; nevertheless there are several reports in which proteins that bind DNA maintain their properties under denaturation conditions (Mannglam *et al.* 1989; Fried, 1989; Waterman and Jones 1989). Figure 6 shows that this dialyzed sample was able to shift again specifically the 180 bp DNA fragment, but not an unrelated control DNA. Thus, the specific DNA binding activity was still present in the renatured sample.

As a second round of purification, we cut the second preparative gel, eluted the complex and re-analyzed it after SDS denaturation. Figure 5B shows that the band of approximately 28

kDa was enriched about ten times with respect to the front migrating material. This result suggest that the component that interacts most specifically with the 180 bp DNA fragment is a protein with an apparent molecular weight of 28 kDa. It is possible that the front migrating material was the result of contamination, since a polypeptide with a similar molecular weight is the major component (about 10 % of the total protein) in *E. histolytica* nuclear preparations (Figure 5C). We can not exclude the possibility that the bound material that migrates with the front is derived from a ribonucleoprotein that is partially disassembled and hence inactivated after repeated rounds of shift-gel purification.

DISCUSSION

The specific localization of different DNA regions as well as RNA-protein complexes in the eukaryotic nucleus has been observed in many systems (Agard and Sedat, 1983; Lawrence et al. 1989; Fu and Maniatis, 1990; Hui-Min et al. 1990). In this report we have presented evidence that the 200 or so copies of the *E. histolytica* ribosomal DNA episome are preferentially localized all along the inner nuclear membrane in the trophozoite stage, appearing to be part of the peripheral chromatin. These results, in view of the previous work of Albach *et al.* (1980), suggest that ribosomal RNA synthesis may occur in the peripheral chromatin and that the episome could be considered as a nucleolar organizer. Our results do not eliminate the possibility that other episome copies are located in other nuclear regions; however, at the level of sensitivity of the assay, grains were only evident in the internal nuclear membrane. Because this nuclear localization is maintained during nuclear division, it seems likely that the episome is in direct contact with nuclear membrane attachment proteins that serve as vehicles for episome segregation during cell division. Other proteins involved in episome functions such as transcription and replication are also likely candidates for being located in the peripheral chromatin.

We performed DNAase I sensitivity assays in order to define the configuration of the episome in the peripheral chromatin. The two separate regions of the episome that contain repeats of the 145 bp element were both found to be especially sensitive to DNAase I. In addition, electrophoresis shift assay and footprinting experiments suggested that the 145 bp element was recognized by nuclear factors. Preliminary characterization showed that the most strongly bound component of these factors was a 28 kDa polypeptide. Other possible less tightly bound polypeptide factors remain to be identified.

One could speculate on a number of possible functions underlying the interaction of the 145 bp element with specific nuclear factors. For example, such a complex could have a role in ribosomal RNA transcription, DNA replication, membrane attachment, control of episome copy number, or in the maintenance of a particular chromatin structure in this region. In other organisms, tandem repeat elements present in the spacer regions of the rDNA cistron are known to act as transcriptional enhancers and are recognized by specific nuclear factors (Solner-Webb and Tower 1986; Bell *et al.* 1989). It has been reported that chromatin proteins of the High

Mobility Group interact with specific repetitive DNA elements promoting a specific chromatin configuration in these DNA regions (Straus and Varshavsky, 1984). A finer characterization of the protein factor(s) that bind to the 145 bp repeat may clarify the role of this element in specific ribosomal DNA episome functions in *Entamoeba*.

Our observations raise the question of whether the factor(s) that recognize the 145 bp element are specific for amoeba strains of so-called "pathogenic" zymodeme. It remains to be determined whether a different protein recognizes specifically the 133 bp repetitive sequence characteristic of "non-pathogenic" zymodeme strains. The 133 bp repeat shows little sequence homology to the region protected in the footprinting experiments (Garfinkel *et al.* 1989), but it is located in the same position in the episome genetic map and presumably would have a similar function. Experiments similar to those presented here, but using nuclear preparations from "non-pathogenic" strains would be required to address this question. A serious obstacle to performing such experiments is the difficulty in culturing "non-pathogenic" strains at the very high cell densities needed to prepare nuclear extracts.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Alejandro Olvera for his expert assistance in the culture of *E. histolytica* trophozoites, and Drs. Alejandra Covarrubias, Patricia León, and Xavier Soberón, for helpful suggestions. We are also indebted to Dr. Isaura Meza for sharing with us her protocols for the preparation of amoeba nuclei and DNA. This work was supported in part by grants from the John D. and Catherine T. MacArthur Foundation and a grant from DGAPA/UNAM, and from the Rockefeller Foundation.

REFERENCES

- Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1983) Three dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature*, **302**, 676-681.
- Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. and Downing, S. (1980) Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in *Entamoeba histolytica*. *Archivos de Investigacion Médica (México)*. **11**, Suppl. 1, 63-74.
- Bell, S.P., Pikaard, C.S., Reeder, R.H. and Tjian, R. (1989) Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell*, **59**, 489-497.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond L.S., Soldo, A.T. (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool*, **36**, 455-458.
- Blake, M.C. and Azizkhan J. C. (1989) Transcription factor required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol.*, **9**, 4994-5002.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1982) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Fried, M. G. (1989) Measurement of protein-DNA interactions parameters by electrophoresis shift assays. *Electrophoresis* **10**; 366-376
- Fox, K.R. and Waring, M. J. (1984) DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin revealed by DNAase I foot-printing. *Nucl Acid Res*, **12**, 9271-9285.
- Fu, X. and Maniatis, T. (1990) Factor required for mammalian spliceosome is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, **343**, 437-441.
- Garfinkel, L.I., Giladi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S. (1989) DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non-pathogenic zymodemes. *Infect. and Immun*, **57**, 926-931.

Huber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S., and Garfinkel, L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol*, **32**, 285-296.

Hui-Min M.C., Shea C., Scott F. Taub, R.N. and Van der Ploeg L.H.T. (1990) Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of the telomers. *The EMBO Journal*, **9**, 2611-2619.

Hutchinson, N., and Weintraub, H. (1985) Localization of DNAase I sensitive sequences to specific regions of the interphase nuclei. *Cell*, **43**, 471-482.

Lawrence, J.B., Singer, R.H. and Marselle (1989) Highly localized tracts of specific transcripts within interphase nuclei visualized by *in situ* hybridization. *Cell*, **57**, 493-502.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.

Mangalam, H.J., Albert, V.R. Ingraham, H. A., Kampiloff, M., Wilson, L., Nelson, C., Elsholtz, H., and Rosenfeld, M.G. (1989) A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes and Development*, **3**, 946-958.

Martínez-Palomo, A. (1982) *The Biology of Entamoeba histolytica*. Research Studies Press/Wiley, Chicester, 269 pp.

Martínez-Palomo, A. (1986) *Biology of Entamoeba histolytica*. In "Amebiasis". A. Martínez-Palomo (Ed.) Vol. 2, Human Parasitic Diseases. Elsevier. Amsterdam. pp. 11-43.

Maxam, A.M. and Gilbert. W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci.*, **74**, 560-564.

Samuelson, J., Acuña-Soto, R., Reed, S., Biagi, F. and Wirth, D. (1989) DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 671-676.

Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza J., Mata-Cardenas, B., Navarro-Montejo, L., Garza-Lozano, G., and Martinez-Rodriguez, H. (1988). PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. of Royal Soc. Trop Med and Hyg*, **82**, 249-253.

Sargeant, P.G., Williams, J.E. and Neal, R.E. (1980) A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9, etc.) " *Trans Royal Soc Trop. Med and Hyg* , **74**, 469-474.

Solner-Webb, B. and Tower, J. (1986) Transcription of clones eucaryotic ribosomal RNA genes . *Ann. Rev. Biochem*, **55**, 801-830.

Strauss, F., and Varshavsky, A. (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell*, **37**, 899-901

Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J. and Arnold, H.H. (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 5118-5122.

Waterman, L. and Jones, K.A. (1989) Purification of TCF-1 α , A T-cell specific transcription factor that activates the T-cell receptor C α gene enhancer in a context-dependent manner. *The New Biologist*, **2**; 621-635

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Nuclear localization of the rDNA episome. A (phase contrast) and B (bright field illumination) of control experiment in which *E. histolytica* was hybridized with a pBR322 fragment used as negative control labelled with [³²P] using the random primers system (Feinberg and Vogelstein, 1982). C (phase contrast), D and E (bright field) of *E. histolytica* hybridized with a [³²P]-labelled restriction fragment containing the 145 bp repetitive element from the rDNA episome; n= nucleus, m=membrane and c= cytoplasm (Instrument magnification, 65X).

Figure 2. DNAase I sensitivity map. A. Lanes 1-6 show an ethidium-bromide stained gel of *EcoRI-HindIII* digested DNA from lambda gt10 clones, containing almost the entire large subunit ribosomal RNA gene and a collection of various segments of the 3' end of the gene (unpublished results). Lanes 7-12 show a southern blot hybridization of the same gel with the *in situ* nick translated DNA (8). The arrows indicate the positive hybridizing bands. B. Lanes 2-5 show an electropherogram of total *E. histolytica* DNA (lanes 2,3, strain HK9; lanes 4,5, strain HM1) digested with *EcoRI* (lanes 2 and 4) and *BglII* (lanes 3 and 5). The prominent bands are located in the episome. Lanes 6-9 show a southern blot hybridization with *in situ* nick translated DNA. The arrows indicate positive hybridizing bands. C. Diagrammatic summary of the DNAase I hypersensitivity mapping data. The vertically dashed bars represent the episome regions that contain the 145 bp repetitive element. The open narrow boxes represent the restriction fragments that fail to hybridize with the *in situ*-nick translated DNA. The shaded narrow boxes represent the restriction fragments that were positive for hybridization with *in situ* nick-translated DNA, (for details see the text). The rDNA cistron map is based on a published report (Huber et al 1989) and on our own observations.

Figure 3. Electrophoresis shift assay of the 145 repetitive element DNA using *E. histolytica* nuclear preparations. A. A [³²P] end-labelled *EcoRI-HindIII* restriction fragment of 180 bp containing the 145 repeat element (1ng per lane), was incubated with nuclear extracts (5 µg of protein; see Experimental Procedures), and with increasing amounts of herring sperm DNA. Lane 1 contains the free 180 bp DNA, lane 2 the same fragment in the presence of nuclear

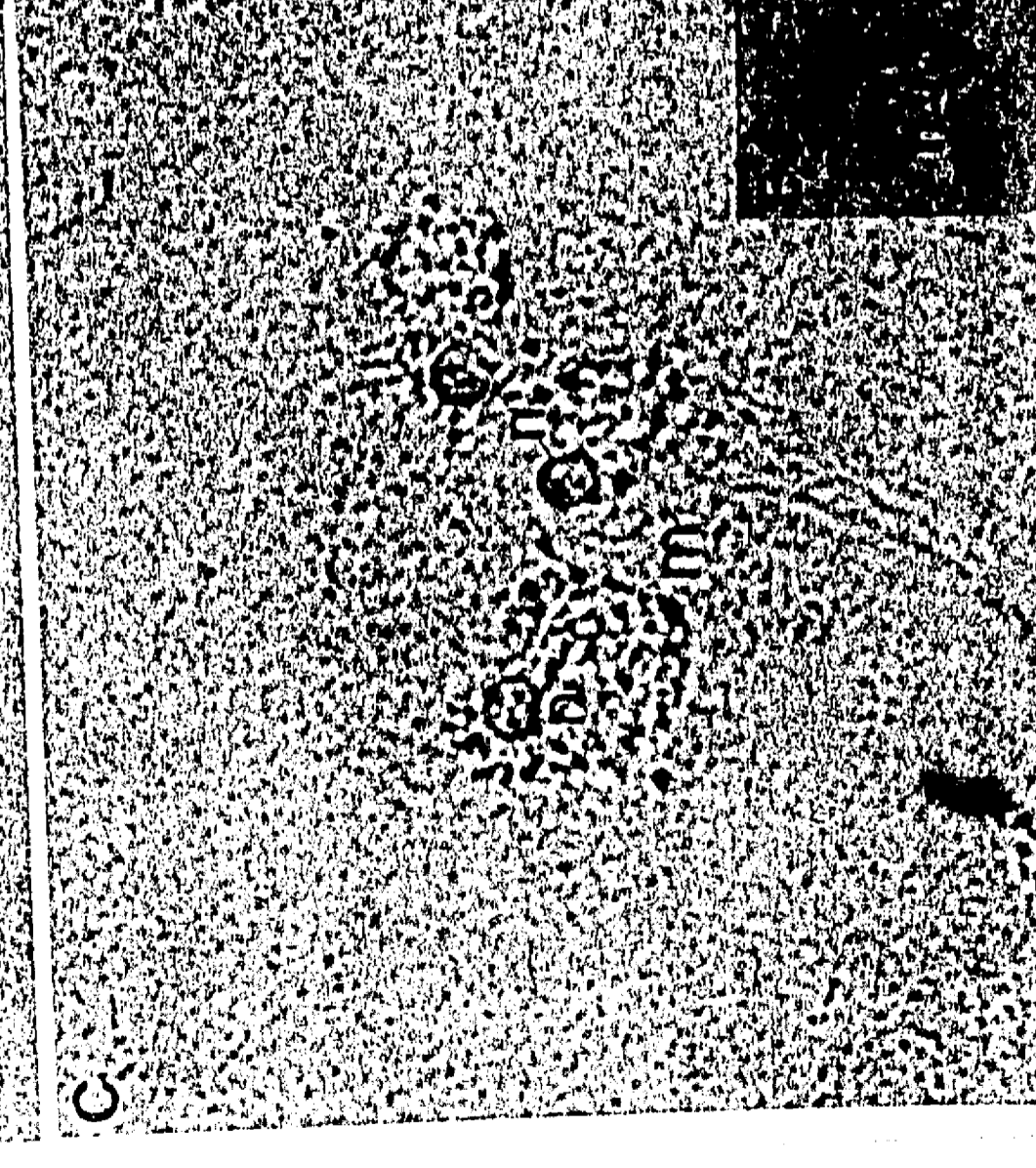
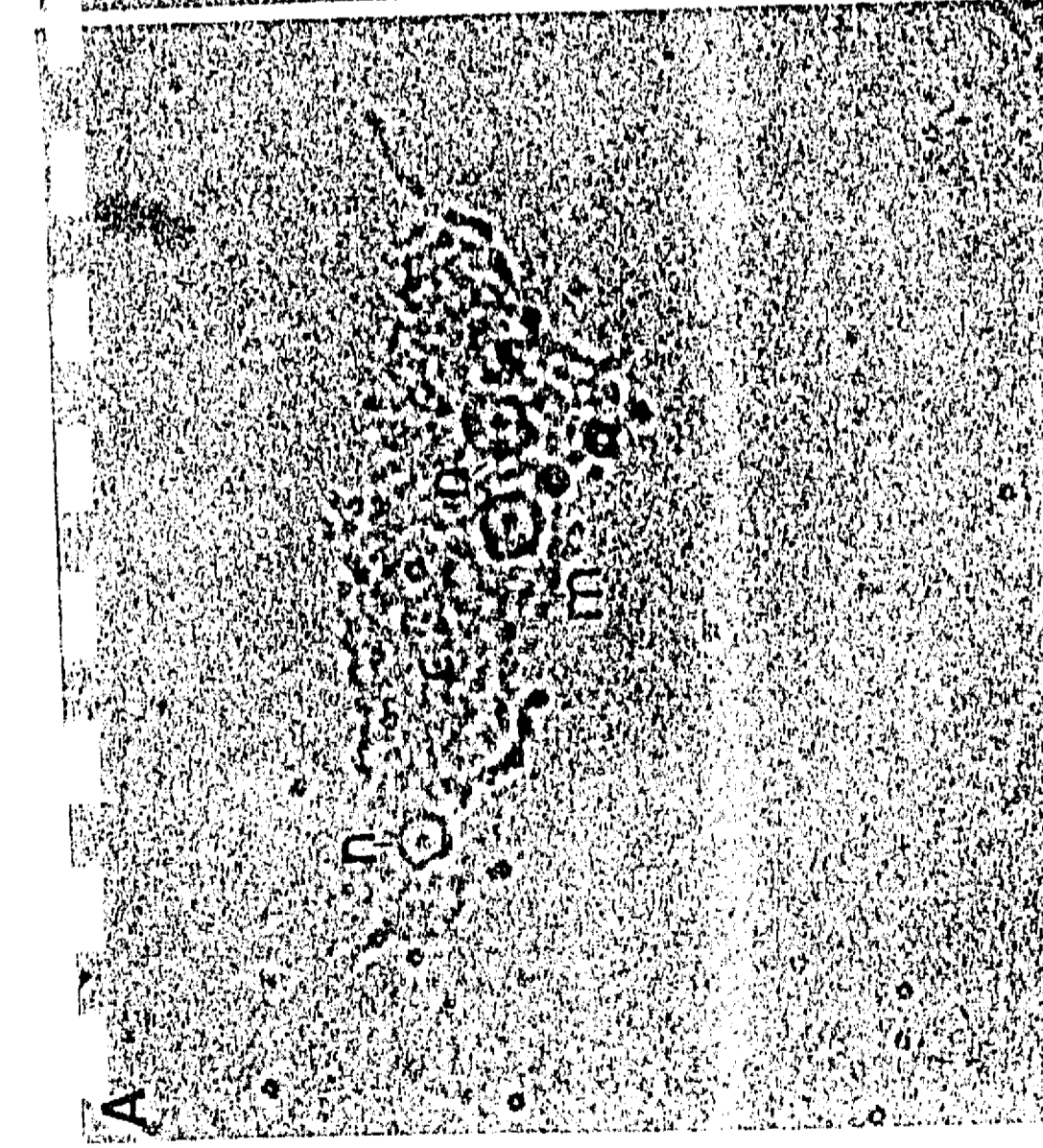
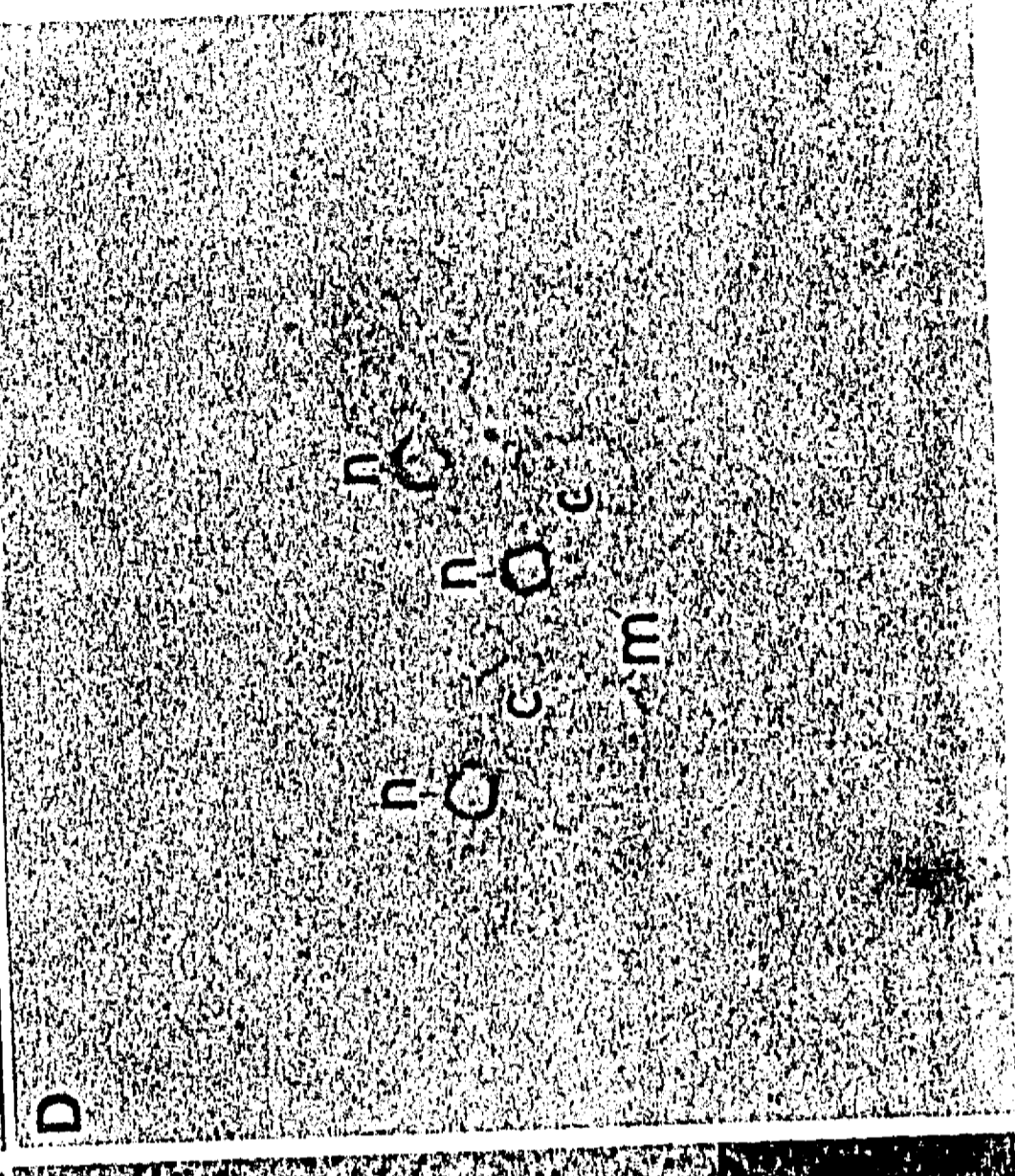
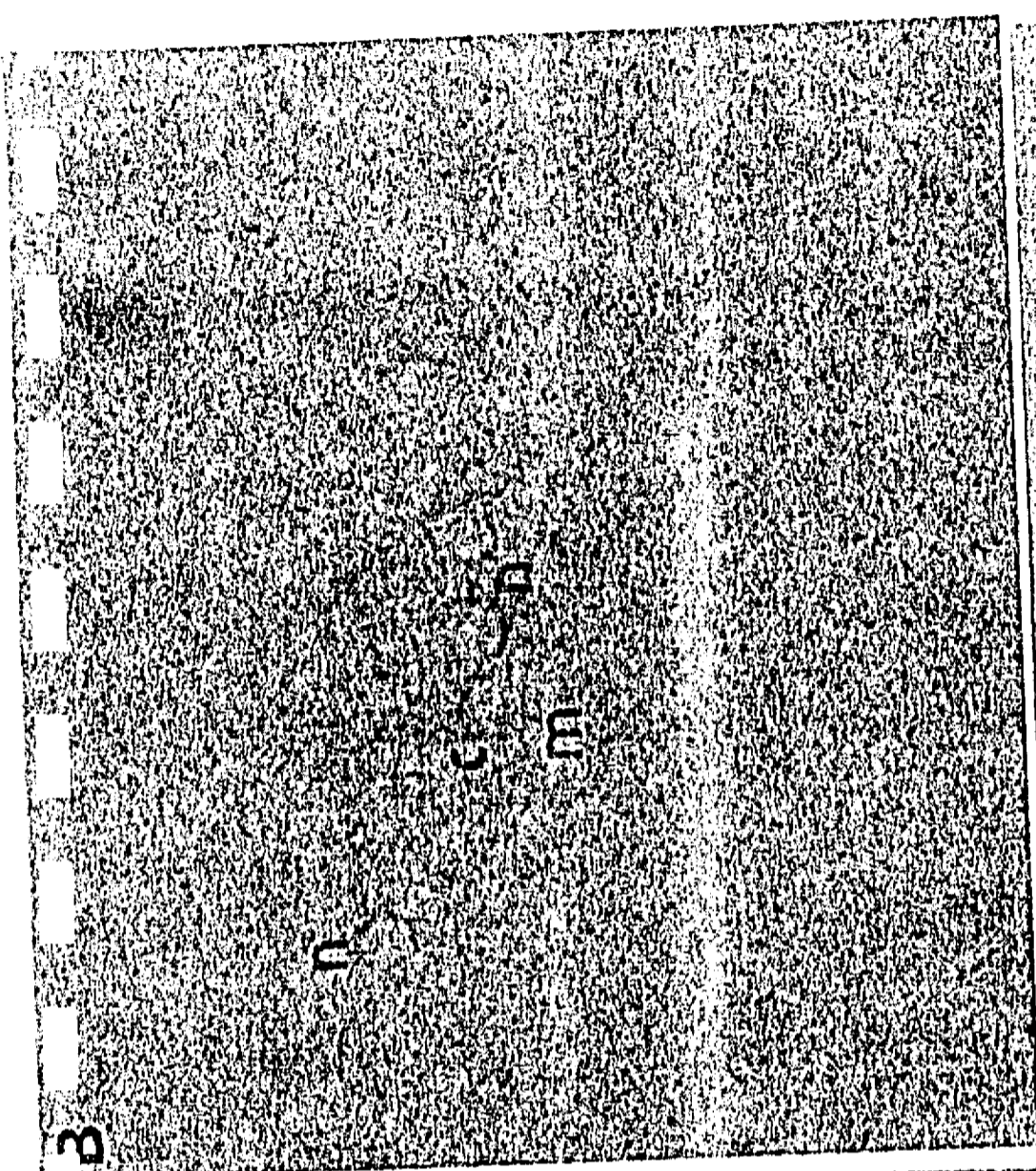
extract, and lanes 3-7 contain in addition increasing amounts of herring sperm DNA (100, 200, 400, 800, and 1600 ng, respectively).

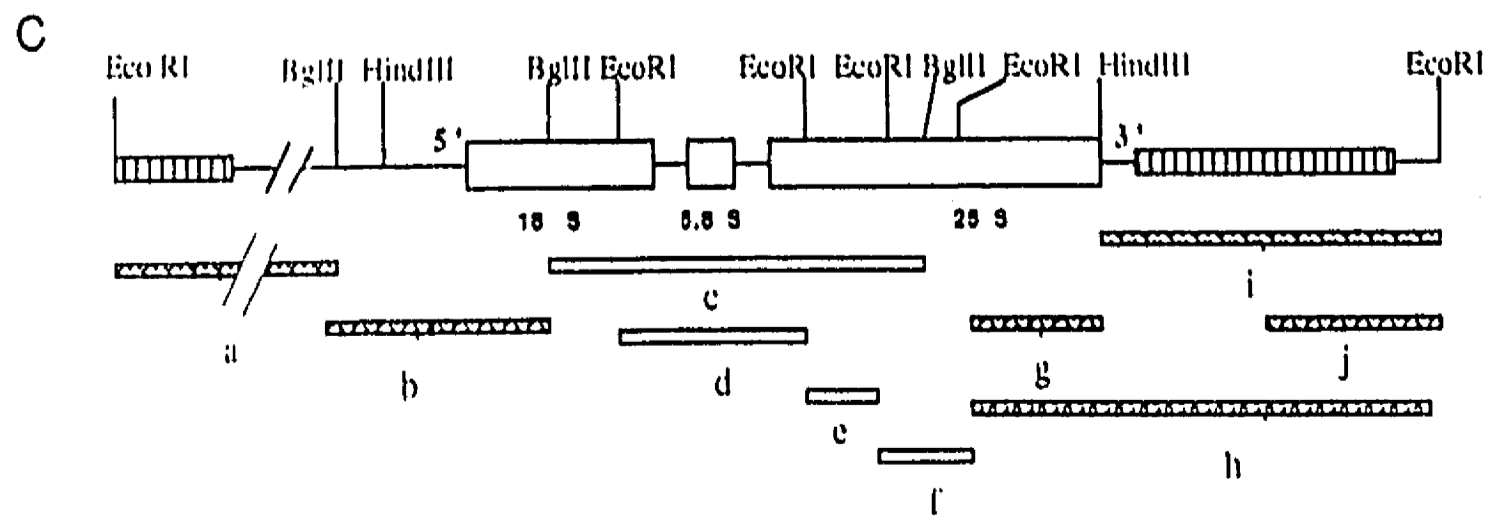
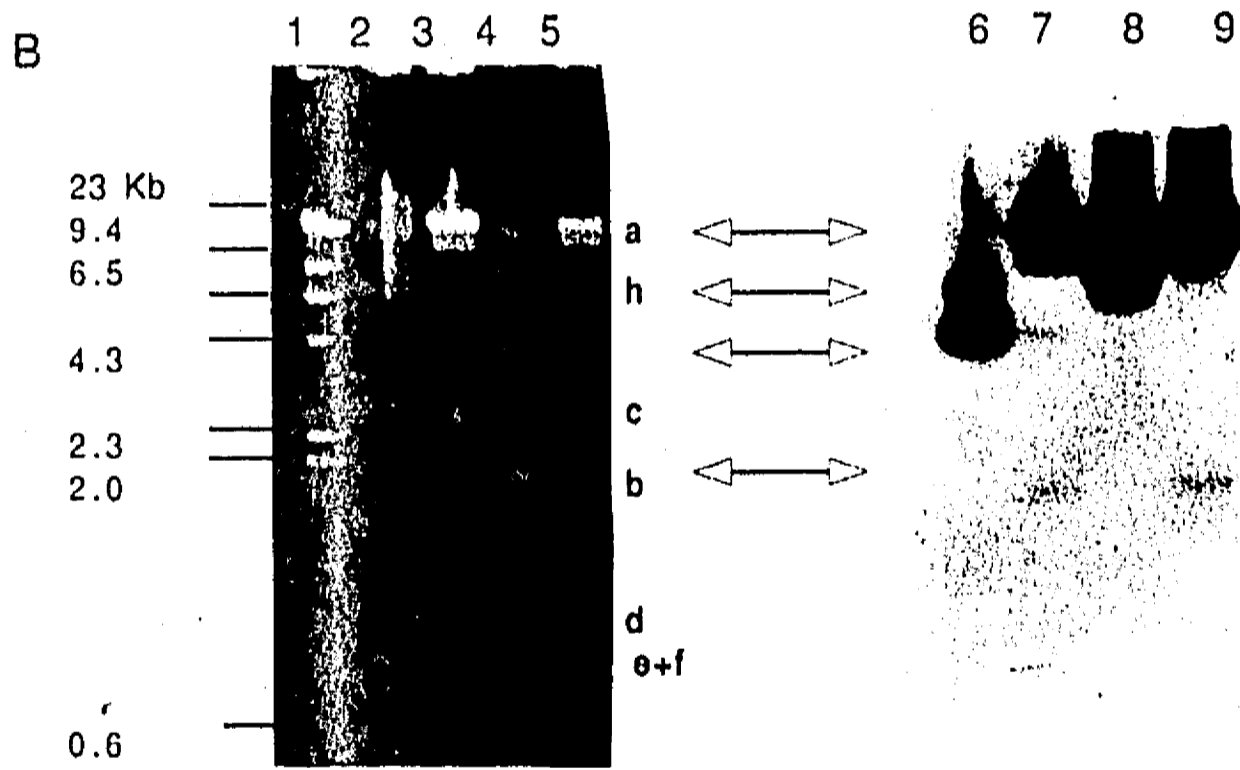
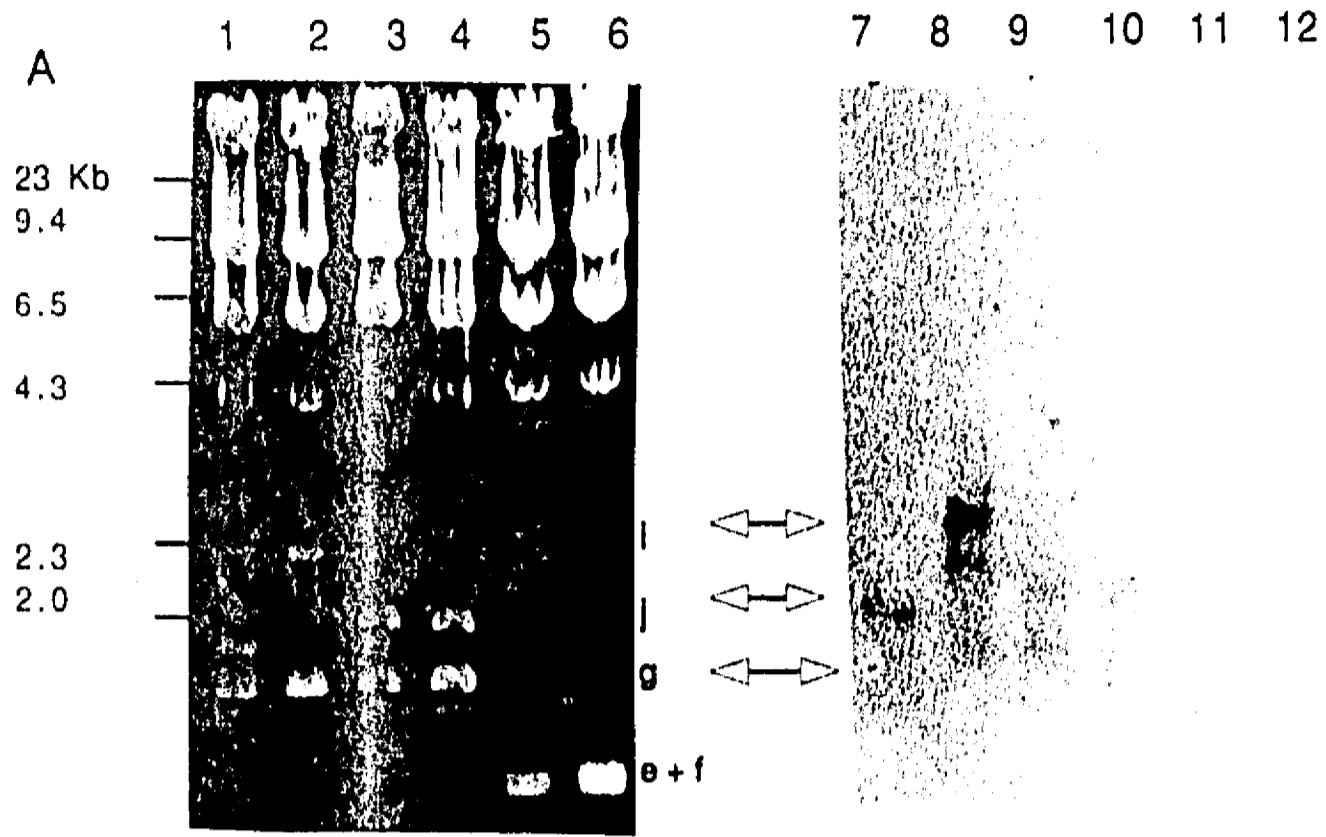
B. The same as A, but with a [³²P] end-labelled lambda DNA fragment as control (1ng per lane). The arrows indicate the position of the DNA-protein complex: top arrow, complex 1, bottom arrow, complex 2.

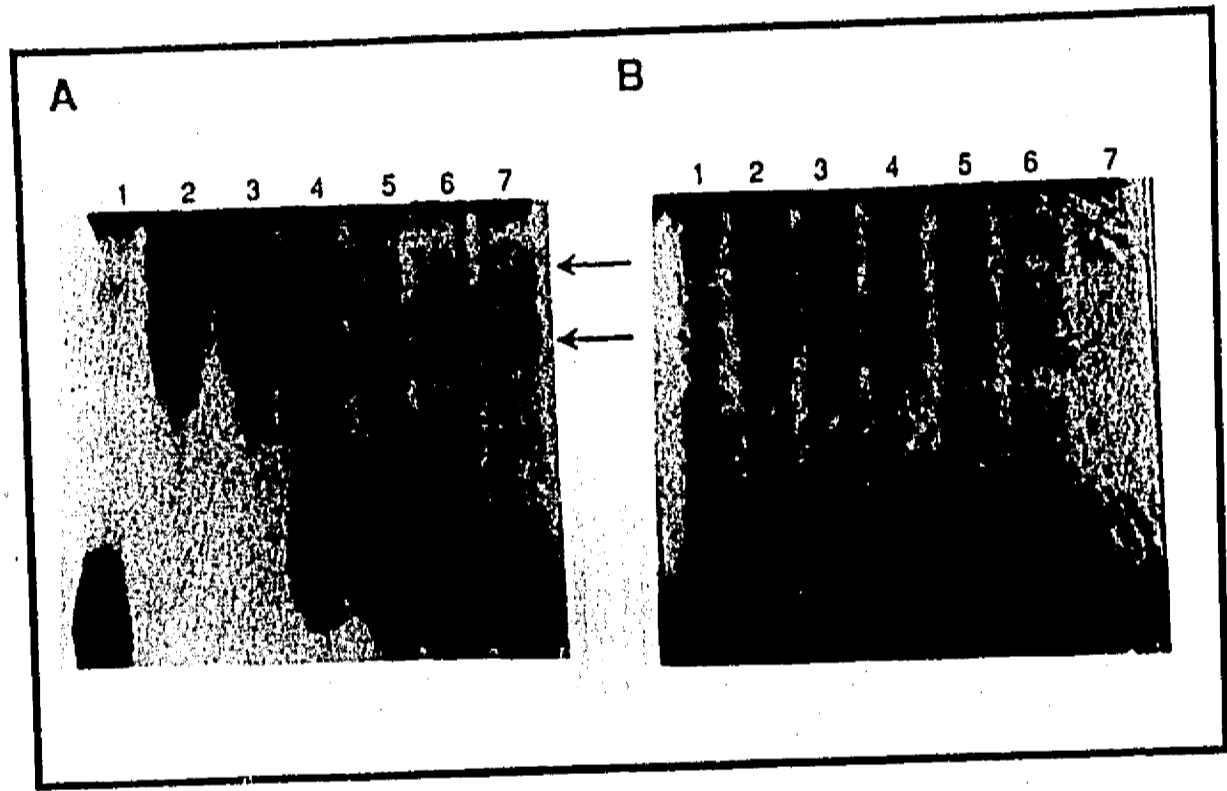
Figure 4. Foot-printing experiment of the 145 bp repetitive DNA element in the presence of *E. histolytica* nuclear preparations. A. DNAase I protection pattern of the 180 bp fragment, that contains the 145 bp element (2 ng per lane), with increasing amount of nuclear proteins (0, 1, 2, 3, and 4 µg) in the presence of herring sperm DNA (0.8 µg). The bar indicates the protected region; lane GA is a Maxam and Gilbert (1977) G+A sequencing reaction of the same DNA as marker. B. Shows the 145 bp element sequence (Garfinkel et al. 1989); the line and the black bar represent the protected sequence. C. Shows an electrophoresis shift assay using a synthetic oligonucleotide of 20 pb (5'-GAAAATCAACGGTGTAATT-3') lane 1 contains the free oligo (10 pmols), lane 2 the same oligo in the presence of nuclear extract, lanes 3 and 5 contains the same oligo in the presence of two and ten times of unlabeled oligo respectively and lanes 4 and 6 contains the same oligo in the presence of two and ten times of a non related 20 mer oligonucleotide. (see text for details).

Figure 5. Analysis of the polypeptides that interact with the 180 bp DNA fragment using analytical PhastSystem (Sodium Dodecyl Sulfate, 12% polyacrylamide) gels. A. Eluted sample from the shifted DNA-protein complex B. Fraction recovered after a second round of preparative shift gel elution. C. Total polypeptides present in the *E. histolytica* nuclear extracts. The arrows indicate the position of a ~28 kDa polypeptide. The "DNA" label in panel A indicates the position of the 180 bp DNA fragment that was identified by staining an identical gel with ethidium bromide.

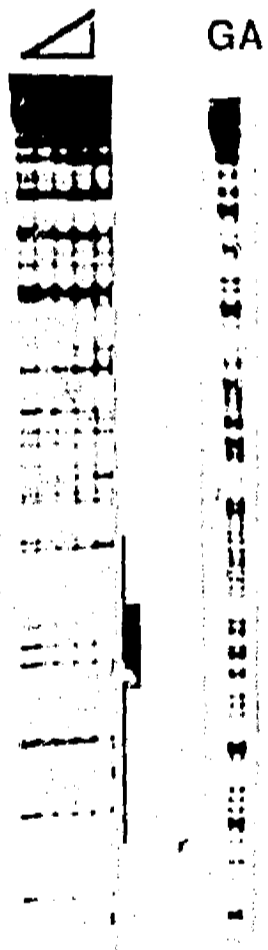
Figure 6. Electrophoresis shift assay of the eluted protein incubated with a 180 bp DNA fragment containing the 145 bp element. Lane 1 shows the 180 bp DNA fragment incubated only with buffer; lane 2: the 180 bp DNA fragment incubated with buffer plus 10 μ l. of the renatured sample; lane 3: the 180 bp DNA fragment incubated with buffer plus 20 μ l. of the renatured sample; lane 4: non-related DNA incubated with buffer plus 10 μ l. of the renatured sample; and lane 5: non-related DNA incubated with buffer plus 20 μ l. of the renatured sample. Electrophoresis was at 200 V for 5 hrs. The arrow shows the migration of the upward shifted complex.







A

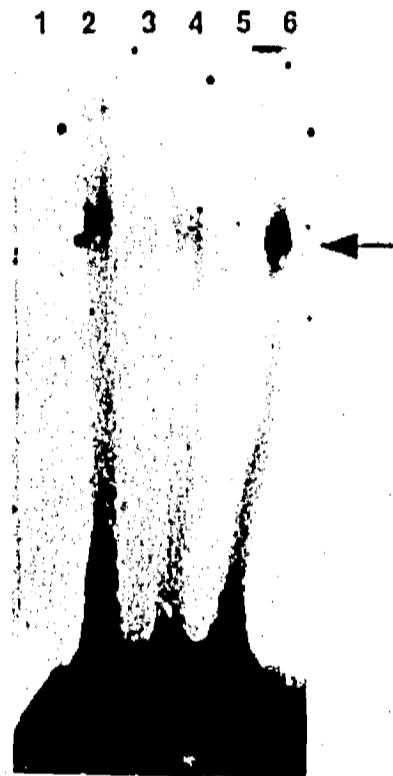


B

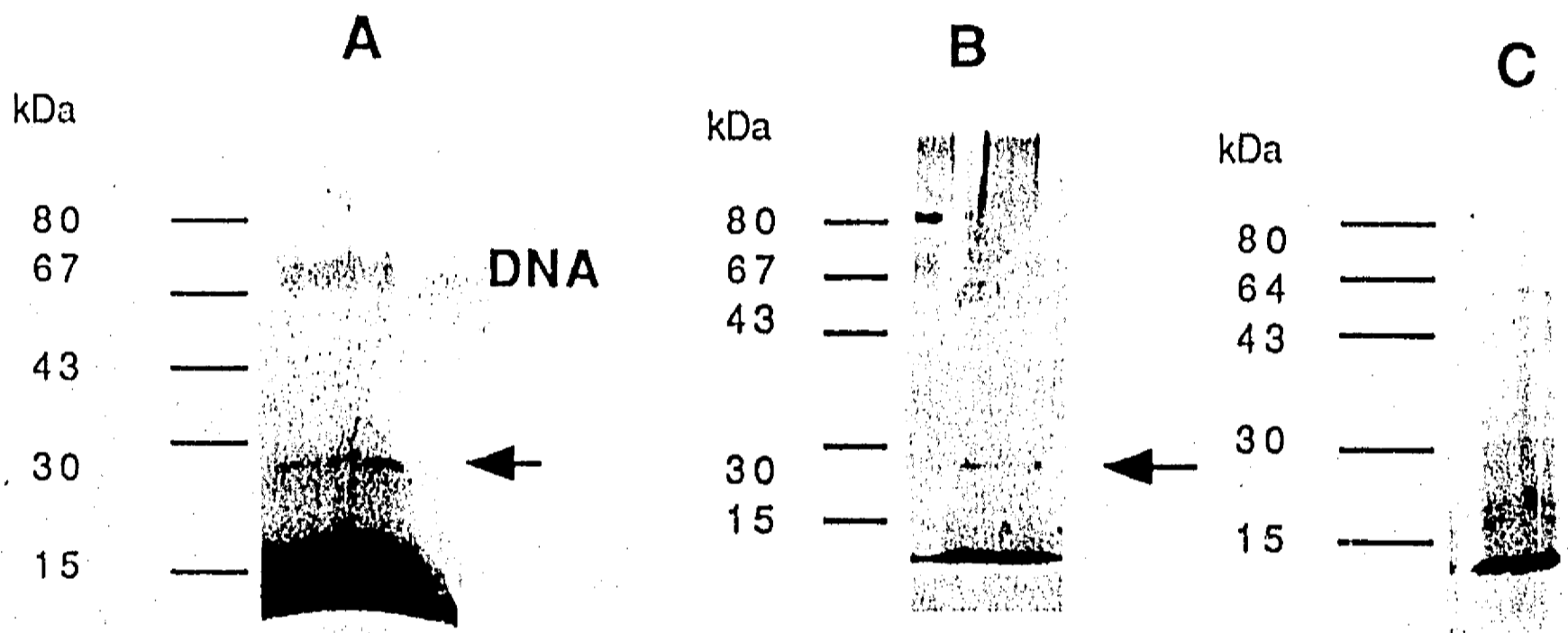
P145 ELEMENT

GATCGATTTTCCCAGTTAGAAATTATTGTACTTTGTATTT
 AGTACTTTTCATTAAAAATGGTGAGGTTCTTAGGAAATCC
 GAAAATCAACGGTGTAATTGGTCAAAAAATATTTGCCT
 AGACGACGACCATTTTGAATAATTCGATC

C

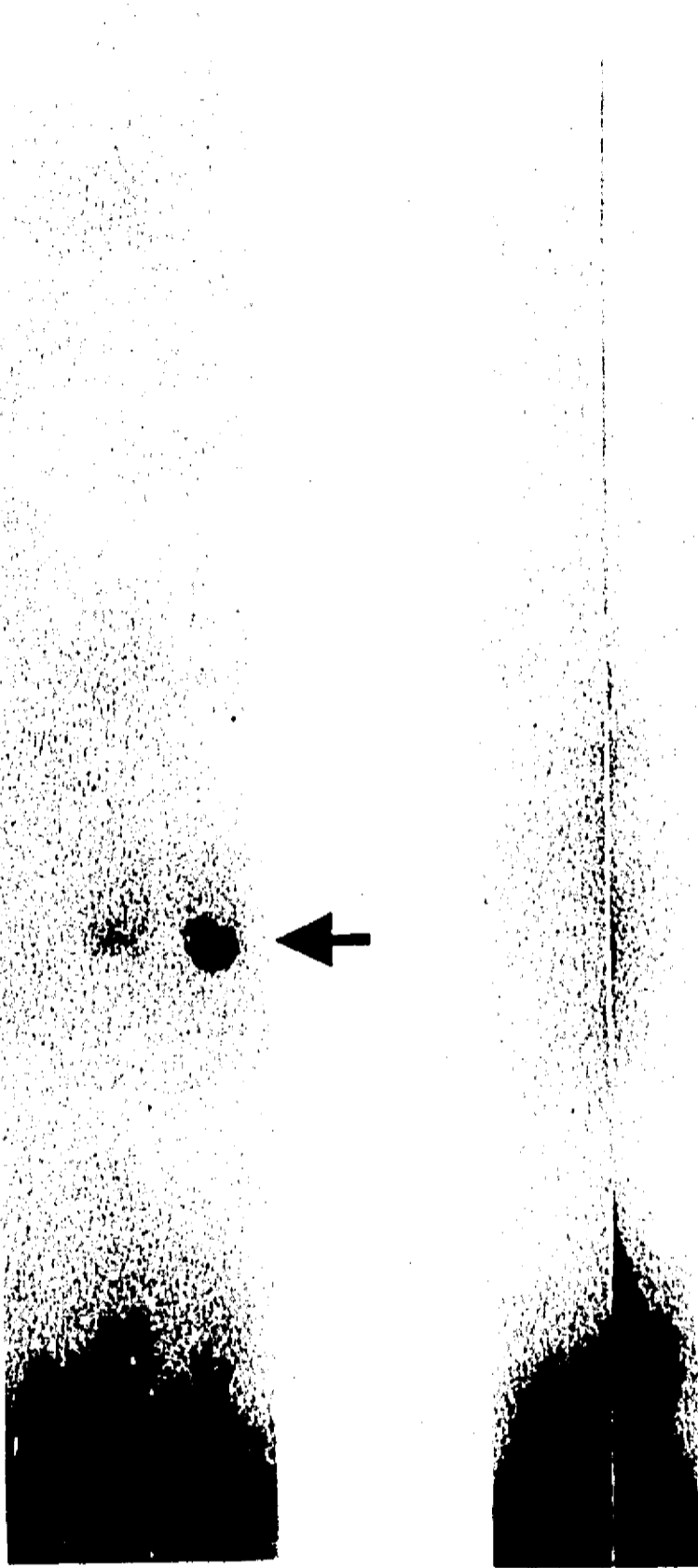


5'-GAAAATCAACGGTGTAATT-3'



1 2 3

4 5



p 145
DNA

non-related
DNA