

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2
2ej.

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

OBTENCION Y CARACTERIZACION
DE UN FRAGMENTO DEL GENE SRP54
DE *Entamoeba histolytica*.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

GABRIEL CUAUHEMOC MERCADO BESSERER.

CUERNAVACA, MOR.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Agradecimientos

Por la excelente ayuda técnica se agradece a :

Georgina Estrada Navarrete
Paul Gaytán Colín
Rene Hernández Vargas
Alejandro Olvera Rodríguez
Felipe Olvera Rodríguez

Por las valiosas observaciones, críticas, aportaciones y discusiones se agradece a :

Mario I. Camacho
Francisco Cavieres
Laurence Colín
Carlos Gonzalez
Bertha Michel
Luis Mendoza
Raúl Miranda
Ernesto Ortiz
Helena Porta
Isabel Tussié
Fabrizio Zepeda

Por la revisión crítica de esta tesis se agradece al jurado :

Jean Louis Charli Casalonga
Rubén López Revilla
Ruy Pérez Montfort
Rosana Sánchez López
Mario E. Zurita Ortega

Por su ayuda administrativa agradezco a :

Alejandra Jasso

Especialmente se agradece por su enseñanza a :

Alejandro Alagón Cano
Paul M. Lizardi López
Luis Miguel Salgado Rodríguez

Agradezco al Centro de Fijación del Nitrógeno, Instituto de Biomédicas al Instituto de Biotecnología y a la UNAM por mis estudios.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DEL Dr. ALEJANDRO ALAGON CANO Y DEL Dr. PAUL M. LIZARDI LOPEZ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO EN CUERNAVACA MORELOS.

BAJO LA DIRECCION DEL Dr. ALEJANDRO ALAGON CANO Y DEL Dr. PAUL M. LIZARDI LOPEZ.

DURANTE LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO FUI BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA Y DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO.

INDICE.

ABREVIATURAS.	Página 4
RESUMEN.	Página 5
INTRODUCCION.	
I.- Generalidades del Transporte Celular.	Página 6
II.- Generalidades de la secreción.	Página 7
III.- Transporte de las proteínas a través del retículo endoplasmático.	Página 9
IV.- El complejo SRP.	Página 15
ANTECEDENTES.	
I.- <i>Entamoeba histolytica</i> . Agente etiológico de la amibiasis.	Página 19
II.- Ciclo de vida y morfología de <i>Entamoeba histolytica</i> .	Página 19
III.- <i>Entamoeba histolytica</i> como modelo experimental.	Página 20
IV.- SRP54 como candidato para el estudio de la vía de secreción en <i>Entamoeba histolytica</i> .	Página 21
OBJETIVOS.	Página 23
MATERIALES Y METODOS.	
I.- Soluciones y amortiguadores.	Página 24
II.- Cepas y medios de cultivo.	Página 26
III.- Plásmido.	Página 27
IV.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.	Página 28
V.- Técnicas de electroforesis en gel.	Página 29
VI.- Purificación y medición de la concentración del DNA.	Página 30
VII.- Obtención de los oligonucleótidos para PCR.	Página 35
VIII.- Preparación y análisis de los oligonucleótidos que se diseñaron	

para PCR.	Página 35
IX.- Reacciones de PCR.	Página 36
X.- Preparación del plásmido pGEM-4Z.	Página 37
XI.- Preparación y ligación del producto de PCR SRP54 al plásmido pGEM-4Z.	Página 38
XII.- Preparación y transformación de células competentes.	Página 39
XIII.- Sondeo directo por PCR.	Página 40
XIV.- Secuenciación del inserto de SRP54.	Página 41
XV.- Análisis de las secuencias.	Página 42
RESULTADOS.	
I.- Diseño y análisis de los oligos.	Página 43
II.- Obtención y resolución del producto PCRSRP54 de <i>Entamoeba histolytica</i> .	Página 45
III.- Clonación del producto PCRSRP54 de <i>Entamoeba histolytica</i> .	Página 45
IV.- Resultado del sondeo para encontrar clonas que tuvieran el plásmido con el inserto del producto PCRSRP54.	Página 46
V.- Secuenciación y análisis del inserto de la Clona 41.	Página 47
DISCUSION Y CONCLUSIONES.	
	Página 49
REFERENCIAS.	
	Página 53

ABREVIATURAS.

ffh: Homólogo de SRP54 (Fifty-four homologue).

G, A, T o C: Residuo de guanina, adenina, timina o citosina.

HSP70: Proteína Inducida por choque termico de 70kDa (Heat Shock Protein).

MPM: Marcador de peso molecular.

Mutantes *sec*: Mutantes de secreción.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

RER: Retículo endoplásmico rugoso.

SRP: Partícula de reconocimiento de la secuencia señal (Signal Recognition Particle).

SRP54: Subunidad de 54kDa del SRP (Signal Recognition Particle subunit of 54 kDaltons).

SR: Receptor del SRP (Signal Recognition Particle Receptor).

SRR: Receptor de la secuencia señal (Signal Sequence Receptor).

RESUMEN.

Estamos interesados en estudiar los mecanismos moleculares de la secreción de proteínas en *Entamoeba histolytica*. Por lo que entre otras estrategias se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR una región del gene de la subunidad de 54 kDa del SRP de este organismo.

Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado. Se purificó y se clonó.

La caracterización de la secuencia obtenida de una de las clonas muestra que ésta tiene una gran homología con otras secuencias reportadas para SRP54 de otras especies. La composición y uso de codones del fragmento, son semejantes a los reportados para otros genes de *Entamoeba histolytica*.

Se discuten la estrategia para la clonación y la caracterización posterior del gene completo de SRP54, así como también se discute las implicaciones de un sistema de secreción basado en SRP para *Entamoeba histolytica*.

INTRODUCCION.

I.- Generalidades del Transporte Celular.

Todas las células están compuestas de membranas, complejos protéicos y otros componentes que se encuentran discretamente y dinámicamente localizados en diferentes regiones dentro y fuera de ellas. Esta localización específica de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y de los otros componentes que conforman a las diversas células procariotas y eucariotas les ha permitido llevar a cabo con éxito las diferentes funciones biológicas necesarias para su supervivencia (Alberts y col, 1989).

Existen diversos y especializados mecanismos celulares para transportar, dirigir y asegurar la correcta localización de los organelos, las vesículas y las otras macromoléculas celulares tanto si acaban de ser sintetizadas, si van a ser degradadas, si están siendo recicladas, si vienen del exterior (como en el caso de la endocitosis), si se dirigen a él (como en el caso de la secreción), o sólo se encuentran en tránsito dentro de la célula.

Todos los tipos de transporte dependen de los diferentes gradientes (químicos y/o eléctricos), y de la dinámica acoplada al citoesqueleto. Mientras que la correcta dirección y localización dependen del reconocimiento de señales dentro de la propia célula.

En las células eucariotas el grado de especialización y complejidad de los mecanismos de transporte, dirección y localización es mayor aun que en el caso de los procariotas. Ambos se distinguen por las siguientes características:

a) El número de moléculas diferentes y distribuidas específicamente es mayor en las eucariotas que en las procariotas.

b) Las eucariotas están compuestas de diferentes organelos que interactúan conjuntamente.

y diferencialmente entre ellos para el correcto ensamblaje y mantenimiento de la célula.

c) Existen una gran cantidad de organismos eucariotas que son pluricelulares y en los que existe una diferente especialización de estos mecanismos entre sus propias células, las cuales pueden compartir entre ellas algunos de los sistemas básicos, pero que además pueden especializarse en algunos de ellos y suprimir o modificar la calidad de los otros. Por ejemplo el sistema de secreción que utilizan las células del páncreas para la secreción de proteasas, lipasas, carbohidrasas y nucleasas al espacio extracelular es prácticamente el mismo que utilizan las neuronas especializadas en la secreción de neurotransmisores u hormonas específicas, mientras que las células del lumen intestinal se especializan en transportar moléculas a través de ellas hacia el torrente sanguíneo.

II.- Generalidades de la secreción.

Uno de los mecanismos más generales utilizado para la secreción, y que está conservado entre los eucariotas, es la vía denominada "Vía de Secreción de proteínas". Ésta está encargada de la construcción y constante renovación de las membranas y proteínas plasmáticas, así como de la secreción de moléculas al espacio extracelular. Hasta ahora esta vía de secreción se ha dilucidado parcialmente por estudios con las técnicas de :

1.- Microscopía electrónica e Inmunoquímica

2.- Fraccionamiento y purificación de los diversos componentes de la vía.

3.- Sistemas de reconstitución libres de células (microsomos o proteoliposomas)

4.- Sondeo de los genes de las proteínas involucradas en la secreción en distintas librerías genéticas.

5.- Identificación de las proteínas involucradas en la secreción por técnicas de entrecruzamiento.

6.- Identificación y caracterización de mutantes de los genes involucrados de alguna manera en esta vía (mutantes *sec*), siendo esta herramienta genética la que ha resultado ser la más poderosa de todas (Deshaies R. J. y col. 1987, Deshaies R. J. y col.

Los **modelos** utilizados han sido diferentes bacterias y células eucariotas, especialmente en el hongo *Saccharomyces cerevisiae*.

Todos los diferentes modelos eucariotas en los que se ha estudiado esta vía, han demostrado compartir muchas de las enzimas y de los mecanismos por los que finalmente se secretan sus proteínas.

Se ha determinado que de una manera general las proteínas sintetizadas en el citoplasma y que van a ser secretadas o localizadas en la membrana plasmática, secuencialmente **maduran** mientras pasan por varios organelos como se señala a continuación (Figura 1):

1.- Mientras las proteínas están siendo sintetizadas en el citoplasma por los ribosomas, estas son **translocadas al lumen del RER** en donde ocurren las primeras modificaciones covalentes (glicosilación e incisión proteica).

2.- Se desprenden **vesículas del RER** que contienen dentro a las proteínas recién translocadas a su interior.

3.- Las vesículas viajan a la **región cis del aparato de Golgi** donde se fusionan con las membranas de esta zona, liberando o exponiendo las proteínas a su interior donde empiezan a ocurrirles nuevas modificaciones covalentes necesarias para su dirección o su función.

4.- Nuevas vesículas se forman (denominadas **vesículas de condensación**) y son transportadas y fusionadas consecutivamente a las regiones reticulares *media* y *trans* del aparato de Golgi, en donde otras enzimas continúan haciendo modificaciones a las proteínas.

5.- Después de pasar por el **aparato de Golgi** las proteínas ya maduras pueden pasar a las vesículas secretorias, en donde son almacenadas mientras esperan la señal para ser

6.- Las vesículas finalmente se fusionan a la **membrana plasmática**, liberando las proteínas al espacio extracelular o exponiendo las proteínas de membrana (receptores, canales, etc...) al exterior.

Variantes de esta vía se encargan de **reciclar** las proteínas al retículo endoplásmico rugoso, de la formación de los **lisosomas** primarios y de las **vacuolas** digestivas, y de transportar las enzimas que finalmente permanecerán en el **aparato de Golgi**.

III.- Transporte de las proteínas a través del retículo endoplasmático.

Un gran número de **proteínas** (incluidas las proteínas de membrana plasmática, las proteínas lisosomales, las proteínas de los endosomas, las proteínas de los organelos de la vía de secreción y las proteínas de secreción) son transportadas al lumen del RER mientras son sintetizadas, antes de que adopten su conformación final (Walter P. y col. 1986).

El principal **mecanismo** en eucariotas, que con sus variantes, parece ser el más importante para el direccionamiento de las proteínas hacia la membrana del RER y su posterior translocación al lumen del retículo endoplasmático o inserción en la membrana del RER, es el que involucra al complejo del SRP (Figura 2). Es notable el hecho de que muchas de las proteínas y de los mecanismos involucrados en la translocación de los péptidos nacientes a través de la membrana del RER tienen homólogos en bacterias que son utilizados para la vía de exportación de proteínas.

A continuación se describe el mecanismo de secreción paso a paso como está señalado en la Figura 2:

1.- Las proteínas que van a ser secretadas empiezan por ser traducidas en el citoplasma

LUMEN DEL RETICULO ENDOPLASMATICO

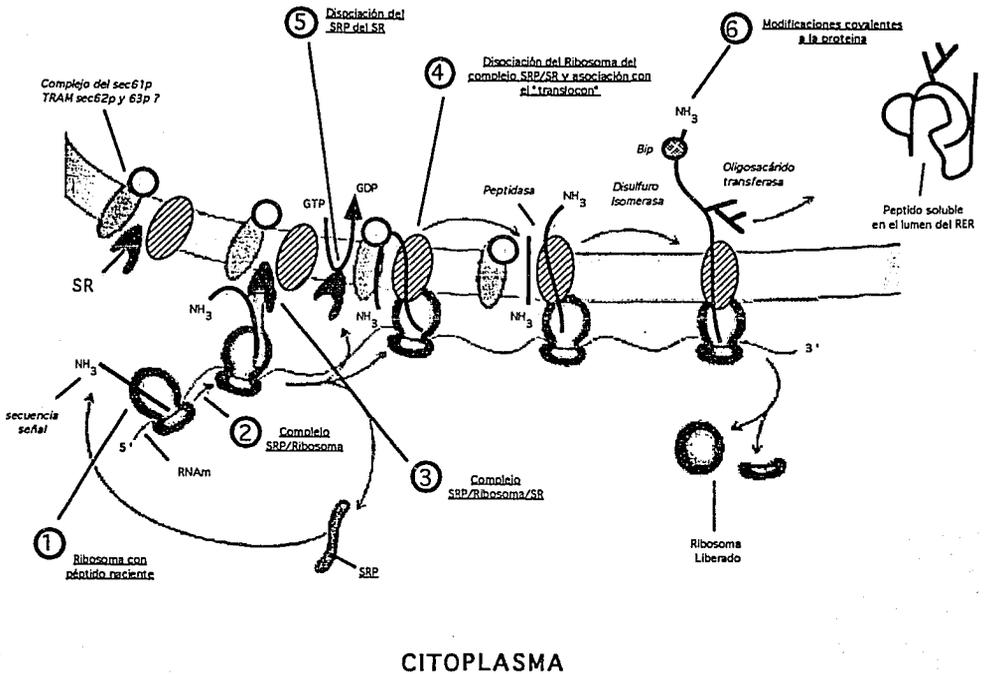


Figura 2.- Representación gráfica del ciclo del SRP involucrado en la translocación hacia el lumen del RER. Los componentes se muestran en *Itálicas*, las oraciones subrayadas muestran las diferentes etapas del ciclo y éstas se describen mas profundamente según su número en la Introducción.

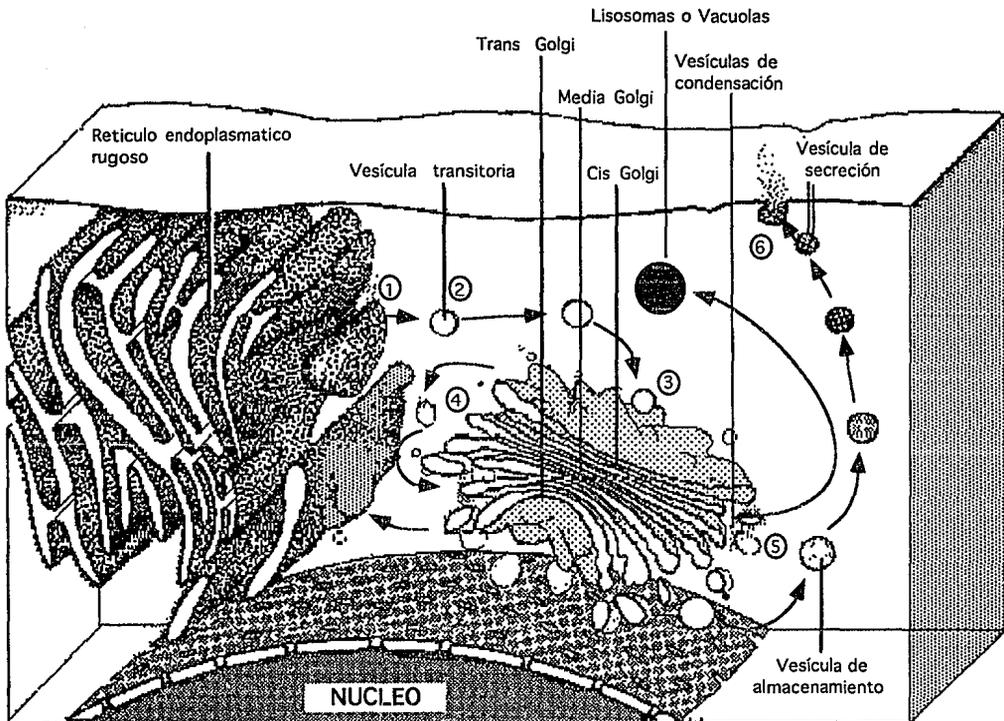


Figura 1.- Representación grafica de la vía de secreción (flechas en rojo) y las vías alternas que de ella se derivan (flechas en azul). Los números muestran las diferentes etapas de la secreción, las que se describen en la Introducción.

hasta que aparezca su secuencia señal fuera del ribosoma.

A.- Las secuencias señal generalmente se encuentran localizadas en el extremo NH_2 -terminal del péptido y se caracterizan por estar formadas por 2 a 4 aminoácidos con carga neta positiva en el extremo más cercano al NH_2 -terminal, 6 a 20 aminoácidos consecutivos de carácter hidrofóbico, seguidos por 6 a 8 aminoácidos que forman doblamientos de la cadena peptídica (como prolina), y finalmente un motivo de tres aminoácidos de cadena lateral corta (AXA en procariotas; donde X es cualquier aminoácido) el cual es el sitio reconocido para su corte por la proteasa del lumen del RER. Si la proteína va a estar embebida en la membrana lipídica la secuencia señal puede estar en cualquier lugar a lo largo del péptido, y generalmente sólo consta de 6 a 20 aminoácidos consecutivos de carácter hidrofóbico, sin motivo de corte para la proteasa (Leader D. P. 1979, Landry S. J. y col. 1991).

2.- En eucariotas la mayoría de las proteínas nascentes se unen al complejo ribonucleico denominado SRP y son dirigidas a la membrana del retículo endoplasmático.

A.- El complejo SRP está formado por 6 subunidades proteicas y un RNA (una descripción más detallada se da en la sección IV de la Introducción).

B.- El modelo actual que se tiene del mecanismo de este complejo nos dice que inmediatamente que la secuencia señal completa emerge del ribosoma (aproximadamente 60-70 aminoácidos después de que el primer aminoácido de la secuencia señal es traducido de su codón en el RNA mensajero, pues 30 aminoácidos aproximadamente permanecen dentro del ribosoma) el complejo SRP se une a la secuencia señal y al ribosoma, deteniendo con esto tanto la traducción del péptido como su plegamiento a su conformación final (sirviendo por lo tanto como una proteína chaperona) (Walter P. y col. 1981).

3.- Después todo el complejo es dirigido específicamente a la membrana del RER donde el SRP se une al complejo proteico de membrana denominado "Receptor del SRP" (SR).

A.- Se sabe que este receptor se encuentra fuertemente unido al RER (Meyer D. I. y col. 1982, Gilmore R. 1982).

B.- El receptor del SRP consta de dos subunidades denominadas $\text{SR}\alpha$ y $\text{SR}\beta$. La subunidad $\text{SR}\alpha$ es la que interactúa con el SRP, pero ambas subunidades son necesarias para la translocación. La subunidad $\text{SR}\alpha$ tiene una región altamente homóloga con uno de los dominios de la subunidad de 54 kDa del SRP (esto ha llevado a postular que en algún momento de la evolución ocurrió una duplicación y variación de alguno de estos genes, y que ambos continuaron funcionando en la vía de la translocación). Ambas regiones se parecen menormente al motivo que une GTP de la familia de proteínas *ras* y parece ser que este dominio en $\text{SR}\alpha$ es importante para el correcto direccionamiento de la secuencia señal. Se sabe sin embargo que ambas subunidades son necesarias para su unión con GTP. En condiciones *in vitro* en presencia de SRP la subunidad α es capaz de intercambiar GDP por GTP liberando así al ribosoma y a la secuencia señal del complejo (SRP/receptor SRP). (Tajima S. y col. 1986, Connolly T. y col. 1991, Rapiejko P. J. y col. 1992).

C.- Homólogos de estas proteínas han sido encontrados en plantas, animales, levadura y bacterias (Rapoport T. A. 1992).

D.- En la reconstrucción artificial (*ab initio*), del mecanismo de translocación de péptidos hacia el interior de proteoliposomas sintéticos, el receptor del SRP mostró ser uno de los componentes mínimos fundamentales para que se lleve a cabo satisfactoriamente la translocación (Görlich D. y col. 1993).

4.- Después del intercambio de GTP a GDP por el SR se libera el ribosoma y la secuencia señal del complejo SRP/SR. Luego el ribosoma y a secuencia señal son transferidos a alguna proteína que debe de cumplir la función de "receptor del ribosoma" y formar parte del complejo hipotético denominado "translocón", que debe ensamblarse en el momento y debe ser el encargado de anclar el ribosoma a la membrana de RER y de empezar a translocar

el péptido a través de la membrana del RER (que desde el momento en que se disoció del complejo SRP/SR reinició su traducción).

A.- Por experimentos electrofisiológicos se sabe que existe un canal en el retículo endoplásmico cuya abertura depende de la correcta asociación de los ribosomas y de la existencia de la secuencia señal (Simon M. S. y col. 1992a). Canales parecidos han sido encontrados en las membranas de la bacteria *E. coli*, (Simon M. S. y col. 1992b). Por esto se sabe que debe de existir por lo menos un tipo de canal que se ensambla o se abre en la presencia del ribosoma y de la secuencia señal y por el que se translocan las proteínas al lumen del RER. El complejo actual ("receptor del ribosoma"/"canal de translocación peptídica"/ "facilitadores") denominado "translocón" no se conoce totalmente, pudiendo estar formado por muchos tipos de proteínas intercambiables dependiendo del tipo de proteína que se va a translocar.

B.- Parece que la proteína codificada por el gene *sec61* (Deshaies R. J. y col. 1987), es un buen candidato para formar parte de este complejo (se han encontrado homólogos en distintas levaduras y recientemente en mamífero, además se sabe que *E. coli* tiene un homólogo parecido denominado *secYp* (Schatz J. y col. 1990, Görlich D., y col. 1992). La predicción de la topología de esta proteína indica que ésta atraviesa la membrana del RER 10 veces formando un canal con una abertura y un ambiente interno por el que se predice podrían pasar todos los tipos de cadena lateral de las proteínas. Además esta proteína es capaz de unirse *in vitro* con los ribosomas que se encuentran sintetizando proteínas con secuencia señal. También se sabe que este canal es capaz de translocar proteínas que aunque ya están totalmente traducidas siguen reteniendo una forma translocable (Sanders S. L. y col. (1992). Munsh A. y col. 1992). Recientemente Görlich D. y col. (1993), encontraron que Sec61p formando un complejo multiproteico junto con otros 2 polipéptidos (denominados Sec 61 β (14 kDa) y Sec 61 γ (8 kDa)), es uno de los componentes mínimos fundamentales para que se lleve a cabo satisfactoriamente la translocación hacia el interior de los proteoliposomas sintéticos.

C.- Otra proteína membranar del retículo endoplásmico denominada **TRAM** (Gorlich D. y col. 1992), es tan abundante como la cantidad de ribosomas unidos fuertemente a la membrana del retículo, sugiriendo que está presente en cada sitio de translocación. La secuencia de esta proteína sugiere que atraviesa la membrana del retículo endoplásmico 8 veces y que tiene una cola de 60 aminoácidos en su extremo carboxilo que ve en dirección del citoplasma. Estudios bioquímicos indican que se trata de una glicoproteína que se une tanto al principio de la secuencia señal como a la proteína Sec61p (Gorlich D. y col. 1992). Estudios de reconstitución recientes (Görlich D. y col. 1993), indican que esta proteína es necesaria para la translocación de algunos péptidos y estimuladora para otros, formando parte de los componentes mínimos necesarios para que se lleve a cabo satisfactoriamente la translocación hacia el interior de los proteoliposomas sintéticos. Lo anterior podría indicar que esta proteína dirige algunas de las proteínas con secuencia señal hacia el canal de translocación.

D.- Otras proteínas (entre ellas las codificadas por los genes denominados *sec62* y *sec63* en levadura) (Rothblatt J. A. y col. 1989), forman un complejo de por lo menos 4 proteínas (al menos con una proteína de 31.5 kDa y una de 23 kDa (Deshaies R. J. y col. 1991)) que junto con la proteína BiP (codificada por el gene *kar2* homólogo al gene *dnak* de procariontes), la cual se sabe se une a *sec63* (Rapoport T. A. 1992), podrían estar facilitando la translocación de la proteína a través del canal (Sanders S. L. y col. 1992) posiblemente al estar tirando de ella hacia dentro del lumen del RER o sirviendo como chaperonas para evitar el plegamiento prematuro de las proteínas.

E.- El multímero de por lo menos 4 subunidades denominado **SSR** (Wiedmann M., y col. 1987), podría también estar involucrado de alguna manera en el translocón, pues aunque más débilmente que otras enzimas se sabe que se une a la secuencia señal y a los ribosomas; así como también se sabe que anticuerpos contra éste complejo detienen *in vitro* la translocación (Hartmann E. y col. 1989). Se postula que podría funcionar reteniendo la proteína dentro del RER (Wada I. 1991).

F.- **Otros factores** que son necesarios para la translocación y que podrían formar parte del translocón en algún momento o tener una relación indirecta o secundaria son :

- a.- Las proteínas de 34 kDa (Tazawa S., 1991), y de 180 kDa (Savitz A. J. y col. 1990), que se postula podrían actuar como receptores del ribosoma para algún tipo de canal de translocación.
- b.- Una proteína de 30 kDa con afinidad por el SRP (Tajima S. y col. 1986).
- c.- Una proteína aun sin identificar que se sabe une ATP cuya hidrólisis es necesaria para la translocación (Klappa P. y col. 1991, Zimmermann D. L. y col. 1991).
- d.- Algunas otras proteínas que se sabe se unen a las cadenas peptídicas nacientes de los ribosomas (Kellaris K. V. y col. 1991, Robinson A. y col. 1987).
- e.- Los productos de los genes *sec 20* y *sec 21*. El producto de los genes *bet2*, *bos1* y *sly2* (Pryer N. K. y col. 1992).

5.- Mientras las proteínas están siendo translocadas por el canal del translocón la secuencia señal se puede doblar e insertar en la membrana del RER o unirse a otras proteínas. También ocurren algunas **modificaciones covalentes** mientras se translocan.

A.- Proteínas chaperonas como la BIP (Bole D. G. y col. 1986, Haas I. G. y col. 1984), mencionada anteriormente, con homología de 60% con la proteína HSP70, podrían unirse transientemente a la proteína que se está translocando para evitar su plegamiento prematuro.

B.- La enzima **disulfuro isomerasa** se encarga de catalizar el rompimiento de las uniones disulfuro entre las cisteínas para asegurar su correcto apareamiento y por tanto la correcta conformación final de las proteínas (Freedman R. B. 1984, Roth R. y col. 1987).

C.- Si el péptido va a ser citosoluble, el complejo enzimático denominado "**peptidasa de la secuencia señal**" (Evans E. y col. 1986, YaDeau J. T. y col. 1989), una de cuyas subunidades parece tener homología con Sec11p (Shelness G. S. y col. 1990), se encarga

de cortar la secuencia señal (en su sitio específico de corte como ya se mencionó) del resto del péptido, liberando así el péptido que se está translocando directamente al lumen del RER.

D.- El complejo enzimático **oligosacáridotransferasa** (Kelleher D. y col. 1992), se encarga de glicosilar a las proteínas nacientes en posición de asparagina, transfiriendo el carbohidrato a partir de glicolípidos que se encuentran en la membrana del RER.

6.- El complejo **SRP** se disocia del receptor del **SRP** (Connolly T. y col. 1991), cuando el GTP del receptor del **SRP** se hidroliza a GDP, liberando el **SRP** al espacio citoplasmático y dejando el receptor de **SRP** en la membrana.

IV.- El complejo **SRP**.

El complejo **ribonucleoprotéico SRP** es el encargado, en la mayoría de los eucariotas, de dirigir la mayor parte de las proteínas nacientes del ribosoma hacia el RER, uniéndose ahí con su receptor, como ya se ha mencionado.

El complejo **ribonucleoprotéico del SRP** está formado por un **RNA** denominado **7SL**, y seis **subunidades** de pesos moleculares de 9, 14, 19, 54, 68 y 72 kDa (Figura 3). Todos estos componentes se han encontrado por sondeo en las diferentes plantas, animales y levaduras en las que se ha buscado (Walter P. y col. 1986).

La nucleasa **S7** del *Staphylococcus aureus* corta al **RNA 7SL** en un sitio no protegido por las subunidades del **SRP**, separando al complejo del **SRP** en 2 dominios funcionales menores, uno formado por las subunidades **SRP9, SRP14** y el otro esta formado por las subunidades **SRP19, SRP54, SRP68, SRP72**. A continuación se explica lo que se conoce de cada una de las partes.

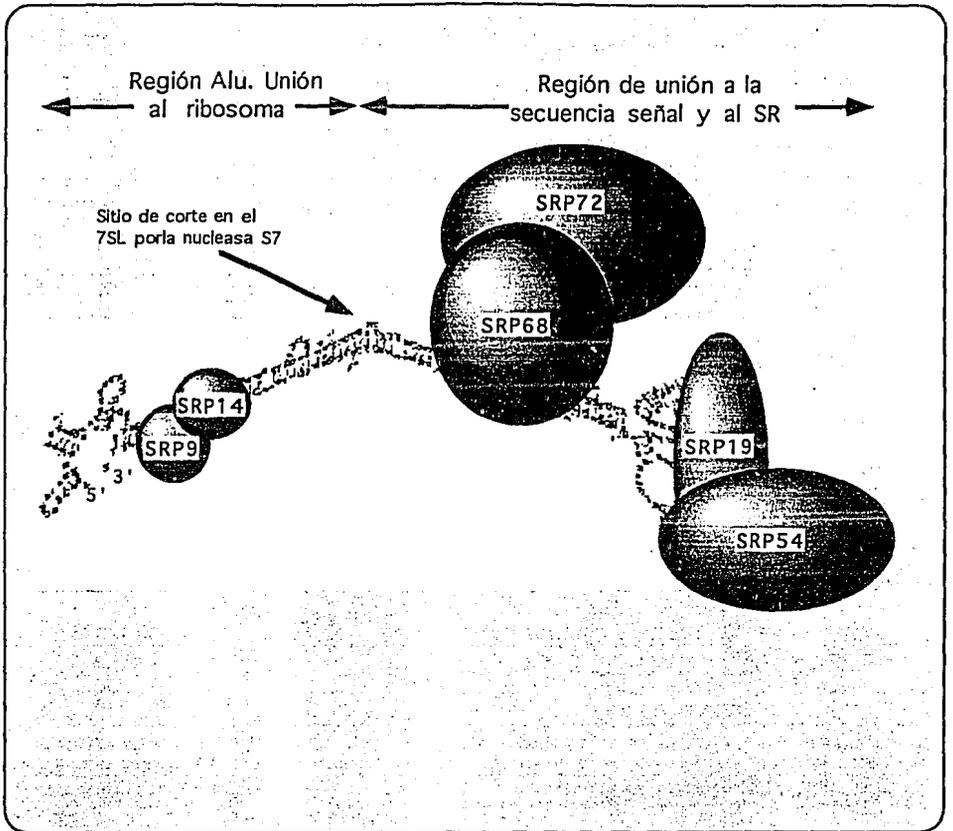


Figura 3.- El diagrama muestra la topología esperada para las 6 subunidades (9, 14, 19, 54, 68 y 72 kD) y el RNA de aproximadamente 300 nucleótidos (7SL), que forman al complejo SRP. Se muestra también el sitio de corte de la nucleasa S7 que resolvió el dominio de unión al ribosoma del dominio de unión a la secuencia señal y al SR.

1.- El RNA 7SL, tiene aproximadamente 300 nucleótidos de largo y contiene IV dominios en su estructura secundaria (Zwieb C. y col. 1989), que son altamente conservados a lo largo de la escala filogenética. Ensayos de mutación de las diferentes regiones han indicado las regiones que son necesarias para el ensamblaje de todo el complejo, algunas de estas mutaciones son letales para los organismos (Bernstein H. D., y col. 1989). Se sabe que este RNA cambia su conformación durante el ciclo de SRP (Andreazzoli M. y col. 1991), pudiendo estar relacionado con la permisibilidad de la dirección que toma el ciclo. Este RNA tiene un homólogo en la bacteria *E. coli* denominado 4.5 S el cual forma un complejo con otras proteínas que son necesarias para la translocación de algunas proteínas a través de la membrana plasmática de esta bacteria.

2.- Las subunidades de 9 y 14 kDa forman un heterodímero que se sabe está en el fragmento menor, resultado del corte por la nucleasa S7, y el cual es necesario para detener la traducción del péptido sintetizado por el ribosoma (Siegel V. y col. 1988), por lo que se cree que deben de tener dominios que se unen a éste. Ambas subunidades son necesarias para su unión con el RNA 7SL (Strub K. y col. 1990); se sabe que se unen a 4 diferentes regiones del RNA 7SL en la región homóloga de la familia de secuencias repetitivas Alu (Strub K. y col. 1991). Sorprendentemente uno de estos contactos es con una región del RNA 7SL altamente conservada a lo largo de toda la escala filogenética y que se predice es cadena sencilla.

3.- La subunidad de 19 kDa se encuentra en el fragmento grande del SRP, resultado del corte por la nucleasa S7, fragmento necesario (junto con las subunidades de 54, 68 y 72 kDa) para la unión del SRP con el secuencia señal y con su receptor (Siegel V. y col. 1988). Esta subunidad se une por medio de su región que va de la posición 113 a.a.-120 a.a., (Zwieb C. 1991), a la región IV del RNA 7SL formada por un "tetraloop" (Zwieb C. 1992). De hecho, esta proteína tiene homología con otras que también se unen a regiones de RNA con "tetraloop" (como la proteína ribosomal S15 de bacterias). Esta subunidad, se sabe facilita cooperativamente la unión del SRP54 al 7SL. La proteína codificada por el gene *sec65* de *S.cerevisiae* es homóloga en secuencia a esta subunidad, por lo que es probable

que este sea, en levadura, el gene codificante para esta subunidad (Stirling C. J. y col. (1992), Hann B. C. y col. 1992).

4.- Las subunidades de 68 y 72 kDa forman de manera natural un heterodímero que se encuentran en la parte del SRP que se une a la secuencia señal y al receptor del SRP. La secuencia de 671 aminoácidos de la subunidad de 7 kDa revela que es una proteína básica a la que hasta el momento no se le ha encontrado homología con ninguna otra proteína de los bancos de datos. Se une a la subunidad de 68 kDa por su mitad carboxilo terminal. La subunidad de 68 kDa se une al RNA 7SL por su mitad amino terminal rica en glicina (Hertz J. y col. 1990), y a su vez a la subunidad de 72 kDa también por su mitad carboxilo, sirviendo pues como puente entre ésta y el RNA. La función de este heterodímero no se conoce, pero se postula que podría tener dominios que son necesarios para su unión con otras proteínas de la membrana del RER (Lutcke H. y col. 1993).

5.- La subunidad de 54 kDa denominada SRP54 es la parte del complejo SRP más estudiada hasta el momento. Homólogos de esta proteína se han encontrado en todos los organismos en los que hasta el momento se ha buscado, incluso esta subunidad tiene homólogos en las bacterias. En *E.coli* el homólogo se denomina ffh (Phillips G. J. y col. 1992). Se ha probado que ambas proteínas son funcionalmente intercambiables entre organismos (Bernstein H. D. y col. 1993).

La proteína SRP54 (Figura 4) tiene por lo menos dos dominios :

A.- La región carboxilo terminal de 22 kDa (determinado por transcritos truncados del gene original), **une a los diferentes tipos de secuencia señal** (High S. y col. 1991, Lutcke W. y col. 1992). Predicciones por diroismo circular de este dominio, nos sugieren que posee por lo menos tres α -hélices ricas, en uno de sus lados, en metioninas y otros aminoácidos hidrofóbicos, los cuales podrían crear una bolsa hidrofóbica en donde los aminoácidos hidrofóbicos de la secuencia señal se podrían acomodar; lo flexible de las cadenas laterales de las metioninas parece ser particularmente apto para cumplir esta

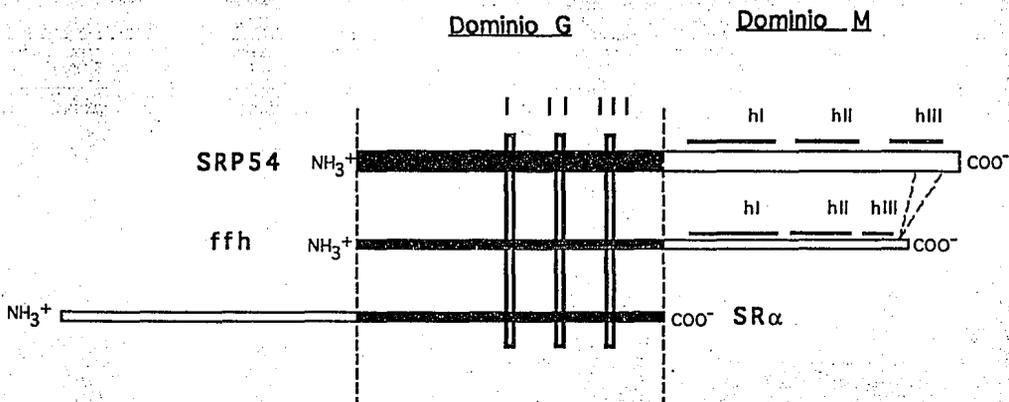


Figura 4.- Esquema de los dos dominios de la proteína SRP54. Se muestra el **dominio G** que se sabe se une e hidroliza GTP, por medio de sus 3 regiones o **cajas** (I, II, III), que se encuentran ultraconservadas entre las diferentes especies. El **dominio M** que se une a las secuencias señal por medio de sus 3 α hélices (hI, hII, hIII), ricas en metioninas y otros aminoácidos no polares, este mismo dominio también se une de alguna manera al complejo SRP19/7S. Aparece además la comparación de los dominios compartidos con su proteína homóloga en *E. coli*, el ffh, y el dominio G de la subunidad α del SR.

función (Bernstein H. D. y col. 1989). Además este dominio posee una región que es necesaria para la unión con el complejo que forman la subunidad 19 kDa y el RNA 7SL (Zopf D. y col. 1990, Selinger D. y col. 1993).

B.- El otro dominio (también determinado por transcritos truncados del gene original), está en la región amino terminal de 33 kDa. Esta región, como ya se mencionó, tiene parecido con el dominio que une nucleótidos de la familia de proteínas *ras*, sobre todo en tres regiones (o "cajas"), que se sabe son las responsables de entrar en contacto con los nucleótidos (Römisch K., y col. 1989, Bernstein H. D. y col. 1989). Experimentos *in vitro* han demostrado que este dominio se une específicamente a GTP y es capaz de hidrolizarlo a GDP. No se sabe si esta función es necesaria para el ciclo del SRP pero se postula que puede tener que ver con el direccionamiento de la secuencia señal al translocón, lograr una asociación modulada con las secuencias señal o el de interactuar de alguna manera con su región homóloga en SR α (Zopf D. y col. 1993).

ANTECEDENTES.

I.- *Entamoeba histolytica*. Agente etiológico de la amibiiasis.

Entamoeba histolytica es el agente causal de la amibiiasis en países en vías de desarrollo, y está clasificada como el tercer agente parásito más importante, después de la malaria y la esquistosomiasis. Se estimó, en el año de 1981, que cerca de 500 millones de individuos en todo el mundo estaban infectados por *E. histolytica* (Walsh J. A. y col. 1986). El 10% de los casos desarrolla amibiiasis invasiva en donde los síntomas van desde una diarrea media y transitoria hasta una colitis ulcerativa crónica (Reed S. L., y col. 1988).

Entamoeba histolytica secreta activamente al espacio extracelular enzimas que destruyen los tejidos de su huésped, permitiéndole eventualmente invadir la mucosa intestinal, entrar al corriente sanguíneo y diseminarse por el resto del organismo (Luaces A. L. y col. (1988), Agrawal A. y col. 1989), lo que resulta en la producción de abscesos amibianos extraintestinales, principalmente en el hígado. Alrededor de 75,000 muertes al año se deben a una amibiiasis invasiva (Guerrant R. L. 1986).

II.- Ciclo de vida y morfología de *Entamoeba histolytica*.

E. histolytica tiene un ciclo de vida que consiste fundamentalmente de cuatro estadios consecutivos que son:

- a) El trofozoito.- Estado móvil de la amiba y el de mayor actividad metabólica. Habita como comensal en intestino grueso del hombre.
- b) El prequiste.- Estadio intermedio entre el trofozoito y el quiste, secreta progresivamente una capa de quitina.
- c) El quiste.- Es la forma infectiva del parásito.
- d) El metaquiste.- Estadio intermedio entre el quiste y el trofozoito.

El endoplasma del trofozoito presenta abundantes vacuolas embebidas en una matriz citoplasmática. Por microscopía electrónica se han identificado diferentes tipos de vacuolas citoplasmáticas (vacuolas fagocíticas, macropinocíticas, lisosomas primarios y secundarios, cuerpos residuales y vacuolas autofágicas) (Martínez-Palomo A. 1982, Aley S. B., y col. 1984, Ravdin J. L. y col. 1986). Muchas de ellas contienen enzimas lisosomales, algunas unidas a la cara interna de las membranas vacuolares. La organización submicroscópica del trofozoito se caracteriza por la ausencia de organelos diferenciados presentes en células eucariotas típicas como: mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y centriolos. Los ribosomas están organizados en arreglos helicoidales que se agregan en inclusiones cristalinas grandes y constituyen los "cuerpos cromatoides" (Dobell C. 1919), que se ven al microscopio de luz. Los cuerpos cromatoides se encuentran frecuentemente asociadas a vacuolas digestivas (Rosembaum R. M., y col. 1970). La morfología del organismo en los otros estadios es menos conocida.

III.- *Entamoeba histolytica* como modelo experimental de célula eucariotas primitiva.

Entamoeba histolytica es un protozoario que pertenece al reino Archezoa, al filum Archamoebae y a la clase Rhizopoda. Se considera que todo el filum se originó de un organismo que divergió en las primeras etapas de la evolución de los eucariotas (Cavalier-Smith T 1991, Bakker-Grunwald T. y col. 1993).

Entamoeba histolytica no tiene mitocondrias, peroxisomas o microtúbulos citoplásmicos, no se le ha identificado un aparato de Golgi o retículos endoplásmicos bien desarrollados etc... Por esto se le ha considerado representativo de los primeros organismos eucariotas que se formaron sobre la tierra, y es considerado como un buen modelo del estudio de los eucariotas primitivos con el fin de entender la evolución que origino a los eucariotas mas complejos. En este respecto amiba nos podría servir para entender la formación y organización de los sistemas de secreción de los eucariotas especializados de nuestros días apartir de los

sistemas de secreción de los organismos mas primitivos (las bacterias).

El estudio de los caracteres primitivos de la amiba asimismopodría servir para el diseño de drogas específicas, antisentido o por ingeniería farmacéutica, que contrarresten su virulencia (el estudio de la secreción es importante aquí pues se piensa que este es el factor principal responsable de la patogenicidad del organismo (Tannich E. 1991)). Por ejemplo recordemos que el metronidazol (medicina prescrita contra la amibiasis), interactúa con la ferredoxina, un acarreador redox cuya presencia en el citoplasma de la amiba se considera un rasgo arcaico (Müller M. 1988).

Se espera además que estudios como el presente servirán con el tiempo para conocer con bases moleculares la morfología, fisiología y diferenciación de los sistemas y organelos de este organismo que no son del todo claros hasta el momento (Martínez-Palomo A. 1982).

Aunque *Entamoeba histolytica* no es un modelo experimental perfecto (debido a que no existen clones y algunos tipos de técnicas no son eficientemente extrapolables a este modelo), presenta las siguientes ventajas: Un ciclo de vida corto (aproximadamente en 13 h se duplica la población en el caso de la cepa HK9). Se tiene bien estandarizado un método de cultivo (ver referencia en Métodos) y algunos tipos de manejo experimental. Además actualmente se ha logrado tener transformantes estables de este organismo (datos sin publicar por James McKerrow).

IV.- SRP54 como candidato para iniciar el estudio molecular de la vía de secreción en *Entamoeba histolytica*.-

SRP54, como ya se mencionó, se encuentra ampliamente distribuido a lo largo de toda la escala filogenética y su función está bien caracterizada. Contiene zonas altamente conservadas que nos permitirán el diseño de primers específicos para obtener productos de PCR que servirán para estudios de regulación, caracterización genómica de este gene y para

la clonación del gene completo, lo que llevara posteriormente a la realización de otros tipos de estudios, tales como la supresión de la expresión de este gene, o la complementación de la función que realiza esta proteína en mutantes de *srp54* en *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS.

- I.- Con base a las secuencias reportadas para SRP54 diseñar oligonucleótidos específicos para la amplificación de un segmento de la subunidad SRP54 de *Entamoeba histolytica*.
- II.- Clonar y caracterizar por secuenciación el segmento de la subunidad SRP54 de *Entamoeba histolytica*.
- III.- Diseñar sondas en base a la secuencia obtenida para continuar el estudio de este gene en *Entamoeba histolytica*.

MATERIALES Y METODOS.

I.- Soluciones y amortiguadores.

El amortiguador TE usado para disolver DNA, consto de Tris hidroximetilaminometano (Tris base) 10 mM pH 7.6, y 3 posibles concentraciones de trabajo para el quelante; ácido etilendiaminatetracetato disódico (EDTA): 1 mM, 0.1 mM o 0.01 mM.

El amortiguador TBE usado para las corridas de geles de acrilamida se preparó en soluciones stock 10X mezclando 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 en un litro de agua bidestilada. La concentración final de trabajo fue Tris-borato 0.09 M, EDTA 0.002 M.

El amortiguador TAE usado para las corridas de geles de agarosa se preparó en soluciones stock 50X mezclando 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 en un litro de agua bidestilada. La concentración final de trabajo fue Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M.

La solución stock al 40% de acrilamida se preparó de la siguiente manera: a 100 ml de agua bidestilada se le agregaron 194.5 g de acrilamida y 5.2 g de bis-acrilamida, se agitó hasta disolver, y se aforó a 500 ml con agua bidestilada; la solución se filtró a través de una membrana Milipore de 0.45 μ m, y se guardó en un frasco ámbar a 4.0° C

La solución de carga para geles de agarosa consto de azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 % y glicerol al 30 % en agua bidestilada.

La solución de carga para geles de acrilamida consto de formamida 95 %, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05 %, xilencianol 0.05 % en agua bidestilada.

La solución stock al 1000X de carbamicilina (un análogo más estable de la ampicilina), se preparó disolviendo un gramo en 5 ml de agua desionizada y tetradestilada (concentración inicial de 200 mg/ml), y se pasó la solución por un filtro Milipore de 0.45 μm . La concentración para seleccionar cepas transformadas en cajas Petri LB-agarosa fue de 200 $\mu\text{g/ml}$.

El amortiguador de lisis-digestión usado en la preparación de DNA genómico de Amiba (Tris-Cl 50 mM pH 7.95, EDTA 0.4 M EDTA, NaCl 100 mM, SDS 0.5 %, Proteinasa K 0.5 mg/ml, iodoacético 5 mM), se preparó añadiendo a 20 ml de EDTA 0.5 M 1.25 ml de SDS 10 %, 23.3 mg de ácido iodoacético y se aforó a 25 ml con agua bidestilada. La proteinasa K se añadió como sólido al volumen que realmente se utilizó a una concentración final de 0.5 mg/ml.

La solución de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 10 %, usada en la purificación de DNA amibiano, se preparó disolviendo 10 g de la sal en 100 ml de agua bidestilada estéril.

El amortiguador de glucosa para la purificación de plásmido se preparó mezclando en 80 ml de agua bidestilada 2.5 ml de EDTA 0.4 M, 2.5 ml de Tris HCl 1M pH 8.0, 1g de glucosa, ajustando el pH a 8.0 y aforando a 100 ml con agua bidestilada. Las concentraciones finales son Tris HCl 0.025 M pH 8.0, EDTA 10 mM, glucosa 1 %. Se filtró por una membrana Milipore 0.45 μm .

La solución de SDS alcalino para la purificación de plásmido se preparó al momento, mezclando en 102 ml de agua bidestilada 12 ml de NaOH 2 N y 6 ml de SDS 20 %. Las concentraciones finales son SDS 1 %, NaOH 0.2 N. Se preparó y guardó en botellas de plástico a temperatura ambiente.

El acetato de potasio 3 M pH 4.9 para la purificación de plásmido, se preparó disolviendo 88.3 g de la sal en 200 ml de agua destilada, se llevó a un pH de 4.9 con ácido

acético glacial, se aforó a 300 ml y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 15 libras/pulgada.

La solución de CsCl se preparó añadiendo exactamente 200 g de CsCl (grado analítico) a 200 ml de EDTA 0.1 M pH8.0.

El amortiguador TC, usado en la preparación de células competentes, consto de Tris 10 mM pH 7.5 y CaCl_2 50 mM.

El amortiguador TCG usado en la preparación de células competentes consto de Tris 10 mM pH 7.5, CaCl_2 50 mM y glicerol 20 % .

El amortiguador TCM usado de un stock 10X, se utilizó para la transformación de células competentes obtenidas a partir de la técnica de calcio. El stock 10X consto de Tris 100 mM pH 7.5, CaCl_2 100 mM, MgCl_2 500 mM. Se esterilizó por autoclave durante 20 min a 15 libras/pulgada.

El amortiguador NSA (No Salt Annealing Solution), usado para el apareamiento del oligonucleótido con el templado de DNA, durante el método de secuenciación, Se preparó en una solución stock 10X que constó de (Tris HCl 400 mM pH 7.5, MgCl_2 200 mM). La solución se esterilizó en autoclave como ya se ha mencionado.

II.- Cepas, medios de cultivo.

Cepa *Entamoeba histolytica* HK9, caracterizada por presentar un zimodemo patógeno tipo II (Said-Fernández y col. 1988).

El cultivo para los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HK9 se llevó a cabo en el medio de cultivo TYI-S-33 bajo condiciones axénicas como descrito por Diamond L. y col. (1968).

Cepa *Escherichia coli* CMK, derivada a las cepas JM109 y JM101 con genotipo conocido de *recA*⁻ y *F*⁺ [*traD36 proAB*⁺ *lacI*^H *lacZΔM15*] integrado al genoma. Usada por su alta tasa de transformación (8.0×10^7 /μg de plásmido).

El cultivo de *E. coli* se realizó en el medio LB (Luria-Bertani). Preparado como se describe a continuación: a 950 ml de agua desionizada se le agregó 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó hasta que los solutos se disolvieron. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a un volumen final de 1 l con agua desionizada, se alícuoto a volúmenes de 100 ml en matraces Erlenmeyer, y se taparon con tapones de algodón y gasa. Se esterilizó en autoclave durante 20 min a 15 libras/pulgada. Para preparar medio LB sólido se agregaron previamente 15 g de bacto-agar.

Cuando se uso antibiótico, se dejó que el medio se enfriara hasta una temperatura de aproximadamente 45° C antes de agregarlo (debido a que el antibiótico es termolábil).

Antes de que solidificara se vertió en condiciones estériles aproximadamente 20 ml a cajas de Petri de 90 mm de diámetro. Se dejaron 20 min a temperatura ambiente hasta que solidificó el agar, se secaron por 20 min en una campana de flujo laminar (dejando las tapas entreabiertas), y se guardaron a 4.0° C hasta su uso. Siempre se dejó una caja a 37° C por 12 h como control de esterilidad.

El almacenamiento de cultivos de bacterias importantes se hizo creciendo una colonia en LB líquido por 12 h y llevándola a 25 % con glicerol estéril. Alícuotas en tubos de 1.5 ml se guardaron a -70.0° C

III.- Plásmido.

Se utilizó el plásmido pGem-4z (Amp^r, sitios y promotores de transcripción Sp6 y T7

flanqueando un sitio M13mp19 de múltiple clonación, región codificadora para la β -Galactosidasa bajo el operón distante *lacZ* y sitio de replicación *ori*, 2746 pb, obtenido de Promega), como vector de clonación, templado para los oligos usados en el sondeo por PCR, y como templado para los oligos de secuenciación.

IV.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.

A continuación se describen las enzimas que se utilizaron y los amortiguadores de ensayo descritos por los fabricantes (a una concentración 10X):

BglII (Boehringer Mannheim): Tris HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 60 mM, MgCl₂ 10 mM y BSA 0.1 mg/ml.

BstI (Boehringer Mannheim): Tris HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y BSA 0.1 mg/ml.

EcoRI (Boehringer Mannheim): Tris HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y BSA 0.1 mg/ml.

EcoRV (Boehringer Mannheim): Tris HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y BSA 0.1 mg/ml.

HaeIII (Boehringer Mannheim): Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM y BSA 0.1 mg/ml.

HindIII (Boehringer Mannheim): Tris HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y BSA 0.1 mg/ml.

SmaI (Boehringer Mannheim): Tris HCl 15 mM pH 8.0, KCl 15 mM, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM y BSA 0.1 mg/ml.

La temperatura de reacción para todas las enzimas fue de 37° C con excepción de Sma I (26° C). Las unidades de actividad definidas por los fabricantes no fueron reproducibles en nuestros experimentos, por lo cual se usaron cantidades de 10 Unidades/ μ g de DNA en 10 μ l de reacción. Los tiempos de digestión fueron de 1/2 h a 4 h según la enzima utilizada. La reacción de digestión se paro con 4 μ l de solución de carga, y los productos de digestión se

analizaron en geles de agarosa TAE 1X 0.8 %, 1.2 %, 1.5 %, como se describe a continuación, dependiendo de los tamaños de las bandas esperadas.

V.- Técnicas de electroforesis en gel.

La técnica para preparación de geles de agarosa es la descrita por Sambrook J., y col., (1989), se usó para el análisis, aislamiento y cuantificación de DNA.

Para el análisis del plásmido se utilizó agarosa (BRL INC.), al 0.8 % concentración final en 40 ml de amortiguador TAE 1X en la cámara BioRad INC. Los fragmentos de DNA de menor tamaño (2000-100 pb) se analizaron en concentraciones variables de agarosa de 1 % a 1.5 % según la resolución deseada (a partir de Brown T.A., 1991). A cada muestra (desde 50 ng hasta 500 ng de DNA si el gel es analítico), se agregaron 2 µl de solución de carga para geles de agarosa por cada 10 µl de solución de DNA. Típicamente se incluyeron estándares de peso molecular conocido como Ladder de 100 pb y de 123 pb (Gibco BRL, citados en Hartley J. L., y col. 1981), para bandas esperadas menores de 600 pb, y DNA de λ (Boehringer) digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII o DNA de λ (Boehringer) digerido con la enzima de restricción BstI para bandas esperadas de un tamaño mayor a 600 pb. Los geles se corrieron a un voltaje de 1 a 5 V/cm (la distancia en cm es igual a la distancia entre los electrodos), en amortiguador TAE 1X con bromuro de etidio a una concentración final de 0.4 µg/ml. Fue importante que el amortiguador con el que se preparó el gel fuera el mismo con el que se hizo la corrida. Cuando el marcador de azul de bromofenol llegaba al final del gel, se detuvo la corrida, y se expuso el gel en un transiluminador de luz ultravioleta. Los registros fotográficos se hicieron en una cámara Pólaroid de enfoque fijo, con un filtro Kodak para U.V.

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 %, urea 7 M, como descrito en Sambrook J. y col. (1989), se preparó de la siguiente manera: justo antes de necesitar el gel, se disolvieron 4.85 g de urea en 3 ml de agua bidestilada, se le agregaron 5 ml de la solución stock de acrilamida al 40 %, 665 µl de TBE 10X, 100 µl de persulfato de amonio 25 % y 3.5 µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina), se aforo a 10 ml y se

vacío para ser corrido en una cámara "tall mighty small" de Hoeffer. 200 ng de cada oligo junto con 5 μ l de solución de carga se corrieron a 350 V y 15 mA hasta que el marcador azul de bromofenol llego al final del gel. Se revelo por 1 min en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1.0 μ g/ml, se removió el exceso de bromuro de etidio en agua, y se expuso en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los geles de secuenciación acrilamida 5 %, urea 7 M, se prepararon disolviendo 63 g de urea (grado secuenciación), en 80 ml de agua desionizada, añadiendo 15 ml TBE10X, 25 ml de la solución stock de acrilamida 30 % (19:1) y se aforaron a 150 ml con agua desionizada. A 50 ml se le añadió 150 μ l de persulfato de amonio 25 % y 150 μ l de TEMED. La solución se usó para sellar la parte inferior de la cámara Bio-Rad para geles de secuenciación. Una vez polimerizado, se añadió a los restantes 100 ml de solución de acrilamida 100 μ l de persulfato de amonio 25 % y 100 μ l de TEMED. Se vació la solución a la cámara. Se dejó polimerizar por lo menos 8 h.

VI.- Purificación y concentración del DNA.

Preparación de DNA amblano genómico de alto peso molecular El siguiente protocolo produjo DNA de más de 50 Kb (7 - 10 μ g DNA/10⁸ células) que contenía aun cierta cantidad de polisacáridos. En varios experimentos, este DNA probó servir como templado para PCR. En amortiguador neutro con Mg²⁺ y a temperatura ambiente el DNA se degrado en pocas horas, lo que indica que la presencia de DNAasas en la muestra es aun muy alta, sin embargo el DNA es bastante estable cuando se precipita con etanol y se mantiene a -70°C. Todas las manipulaciones se realizaron buscando minimizar la ruptura mecánica del DNA, por lo que se usaron las siguientes precauciones:

- Se utilizaron pipetas Pasteur recortadas.
- Las extracciones con fenol/cloroforno y cloroforno hubo que efectuarlas de manera suave.
- Se evito cualquier agitación brusca de la muestra.

El protocolo empleo iodoacetato como posible inhibidor de DNAsas y la precipitación de polisacáridos en presencia de CTAB (Murray y col. 1980). Nótese también que la concentración de EDTA fue mayor que la normalmente recomendada. Los trofozoitos debieron de estar en perfectas condiciones, es decir, que se encontraran en fase de crecimiento activo. Las amibas se utilizaron inmediatamente después de haberlas sacado de la incubadora, se cosecharon y se lavaron con extremo cuidado (no se dejaron enfriar de más y se lavaron con medio basal sin suero, al centrifugar se busco mantener calidad más que cantidad de células).

El siguiente procedimiento fue para 100 a 150 X 10⁶ células. Se enfriaron las botellas de cultivo en baño de hielo durante 5 min y se transfirieron a botellas de centrifugación. Las células se bajaron a 750 X g (2 krpm en el rotor JS-10), durante 10 min a 10° C. Se eliminó el sobrenadante y se transfirieron las células a un tubo Corex de 30 ml. La transferencia se hizo en forma seriada con 4 alcuotas de 2.5 ml de amortiguador de lisis-digestión, usando una pipeta Pasteur recortada (10 ml totales a los que previamente se les añadió la proteinasa K como descrito previamente). Se agitó, por inversión suave, el tubo Corex, tapado con varias capas de Parafilm, de manera tal que se disgregaran los grumos y se rompieran las células. El volumen final se mantuvo alrededor de 18 ml. Se incubaron a 45° C durante 2 h en un baño de temperatura controlada. Se agitaron por inversión suave de 10 a 15 min; al final aun podía observarse una cierta cantidad de residuos. Se eliminó el residuo por centrifugación a 13,000 X g (9 krpm en el rotor JS.13.1) durante 10 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante, con pipeta Pasteur recortada, a 2 tubos Corex de 30 ml (alrededor de 9 ml a cada uno). Se añadió a cada tubo 1.2 ml de 5 M NaCl (concentración final aproximada de 0.7 M) y 1.1 ml de CTAB 10 %. se mezcló muy bien por inversión suave. Se incubaron los tubos a 45° C durante 20 min, agitándolos por inversión suave ocasionalmente. Se agregó un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (relación 24:1), y se mezcló por inversión suave.

Se centrifugó a 13,000 X g (9 krpm en el rotor JS.13.1), durante 10 min a temperatura

ambiente (por debajo de los 15° C el CTAB se precipita), y se removió el sobrenadante viscoso, dejando atrás las interfases, transfiriéndolo a nuevos tubos Corex de 30 ml. Se repitió la extracción y la centrifugación previamente descrita. Se le agregó un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (relación 25:24:1), a cada uno de los tubos. Se extrajo por inversión suave.

Se centrifugó a 13,000 X g (9 krpm en el rotor JS.13.1), durante 10 min a temperatura ambiente. Se removieron los sobrenadantes viscosos, dejando atrás las interfases, y se transfirieron a nuevos tubos Corex de 30 ml. Se precipitó el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol y centrifugándolo a 10,000 X g (8 krpm en el rotor JS.13.1), durante 10 min a temperatura ambiente. Lavando después el precipitado con etanol al 70 % para remover los residuos de sales y CTAB. Este paso se repetía una vez mas si era necesario. El DNA se guardó después de precipitarse con etanol, a -70° C.

El aislamiento de plásmido por maxipreparación se realizó de acuerdo a Birnboim H. C. y col. (1979) y Ish-Horowicz D. y col. (1981). Se inoculó en 5 ml de LB una colonia con el plásmido de interés, éste se dejó crecer agitando durante la noche a 37° C. A 500 ml de LB se agregó el cultivo anterior y se incubó a 37° C en agitación continúa hasta una A de 0.6 a 650 nm de longitud de onda. Se agregaron 25 mg de cloranfenicol y se dejó crecer otras 16 h. Se bajaron las células en botellas de 500 ml en el rotor JA-10 (Beckman) a 5.5 krpm, 0° C por 10 min. Se decantó el sobrenadante.

Para cada medio litro de cultivo se resuspendió su pastilla en 20 ml del amortiguador de glucosa a 22° C disgregando los grumos con la parte ancha de una pipeta de 10 ml, añadiendo después lisozima a una concentración final de 1 mg/ml,

Se incubó el tubo en hielo por 15 min, y se le añade 40 ml de la solución de SDS alcalino a temperatura ambiente agitándolo suavemente en el hielo por 5 min exactamente. Se le añaden después 29 ml de la solución de acetato de potasio 3 M (0° C) y se agita suavemente en el hielo por 7 min. Se centrifugó en un rotor JA-10 (Beckman) a 6 krpm, 0° C por 7 min. Se

decantó el sobrenadante a una botella Corex limpia de 150 ml a través de una gasa estéril. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol a 4° C, revolviéndolo suavemente y dejándolo en hielo por otros 5 min; después se equilibro en agua a 20° C por 10 min. Centrifugándolo después en un rotor JS-5.2 a 5 krpm, 18° C por 15 min.

Se decantó suavemente el sobrenadante y se resuspendió el pellet semiseco en un total de 28 ml de EDTA 0.1 M pH 8.0. Transfiriéndolo después a un tubo de plástico nuevo de 50 ml. Ahí se le añadieron 0.3 g de sarkosil, 30 g de CsCl (grado preparativo). Se disolvió la solución suavemente a 40° C, añadiéndole después 1 ml de la solución de 10 mg/ml de bromuro de etidio. Se llevó todo a 40 ml usando la solución de CsCl.

Se precentrifugó la solución en una centrifuga clínica a 2 krpm por 10 min, transfiriendo el sobrenadante a tubos VTi50 de 1X1.5 pulgadas usando una jeringa con una aguja del número 16. Se sellaron los tubos y se balancearon perfectamente, centrifugándolos después en un rotor VTi50 a 45 krpm a 20° C por 20 h. Se detuvieron sin freno.

Manejando suavemente el tubo, se llevó enfrente de un transiluminador de luz ultravioleta donde se retiró la banda superior de DNA cromosomal y después la banda inferior de plásmido con una jeringa y una aguja del número 16. Se transfirió la muestra que contenía al plásmido a un tubo nuevo, con rosca de polipropileno, de 15 ml.

Se extrajo 4 veces con un volumen igual de isopropanol saturado con CsCl. Se transfirió a un tubo Corex silicizado de 30 ml. Se le añadieron 2 volúmenes de agua tetradesulfada estéril y después 2 volúmenes (con respecto al total de la fase acuosa) de etanol puro. Se almacenó a -20° C de 6 a 18 h pero nunca por más tiempo.

Se centrifugó a 12 krpm a 2° C por 15 min en el rotor de columpio J21. Se tuvo cuidado de remover el sobrenadante suavemente para evitar la pérdida del DNA. Después se disolvió el DNA plasmídico, proveniente de 1 a 4 litros de cultivo, en un total de 1.5 ml de solución de Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM, NaCl 0.15 M estéril. Se filtró por gravedad en una columna

(1.8 cm X 25 cm) de Sepharosa 4B precorrida con un 1 l del amortiguador en el que se disolvió el DNA. Finalmente se precipitó el pico de exclusión del DNA con etanol como se ha descrito y se determinó la concentración del DNA por análisis en gel de agarosa TAE1X 0.8 %, como también se ha descrito.

En general se obtuvieron de 4 a 10 μg por litro de cultivo.

Las **minipreparaciones de plásmido** se realizaron con el kit comercial "Instant-Prep" (5' - 3' INC.), que se basó en inocular en 5 ml de LB una colonia con el plásmido de interés, se creció agitando toda la noche a 37° C. 1-3 ml del medio de cultivo se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo en donde se bajaron las células al centrifugarlas en una microfuga de mesa a 12,000 X g a temperatura ambiente por 60 s. La pastilla se resuspendió en 100 μl de amortiguador TE 0.01 M EDTA pH 8.0. se le añadió 300 μl de una solución de fenol/cloroformo/alcohol Isoamílico (relación 50:49:1), y se pasó a un tubo "Insta-Prep" (que contiene un Gel que separa perfectamente las fases), y se centrifugó en una microfuga de mesa a 12,000 X g a temperatura ambiente por 30 seg. Al sobrenadante se le agregó 200 μl más de la solución de fenol/cloroformo/alcohol Isoamílico, y se repitió la centrifugación. Al mismo tubo se le añadieron 200 μl de una solución de cloroformo/alcohol Isoamílico (relación 49:1), y se repitió la centrifugación.

Se recuperó el sobrenadante y 3 μl del plásmido se digirieron con EcoRI (enzima de restricción con sitio único de corte en el plásmido) en presencia de ribonucleasa A (concentración final de 10 mg/ml). Varios volúmenes de la muestra se cargaron con varias concentraciones conocidas de DNA en un gel de agarosa TAE 1X al 0.8 %, como descrito y se determinó la concentración del plásmido por comparación con los estándares conocidos.

La **elución de bandas de DNA a partir de geles de agarosa** se logró exponiendo los geles en un transiluminador de luz ultravioleta y escindiéndolas rápidamente. Se utilizó después el protocolo estándar del kit comercial de GenCleanII (BIO 101 INC.). Este método se basa en una sílica capaz de unir específicamente moléculas de DNA de peso molecular

mayor de 500 pb, a la que se lavó repetidamente y después se eluye de ella el DNA en agua o buffer de baja concentración. Los rendimientos de purificación fueron mayores al 80 %.

Precipitación por etanol se uso para concentrar el DNA y remover las sales. (Sambrook J. y col. 1989). Se estimó siempre tanto el volumen como la concentración de cationes monovalentes (para no rebasar las concentraciones máximas de estos). Se llevó la solución a una concentración final de 0.3 M con acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 (típicamente mezclándolo con un décimo del volumen final), añadiendo 2 volúmenes de etanol a -20°C y mezclándolo bien. Se precipitó el DNA metiendo el tubo de la solución en un baño de hielo seco y etanol industrial (-70°C) por 30 min. Se recuperó el DNA centrifugando la solución en una microfuga de mesa a $12,000 \times g$ a 4°C por 15 min. Se lavó dos veces con etanol al 70 % llenando el tubo hasta la mitad, mezclando bien y centrifugando la solución en una microfuga de mesa a $12,000 \times g$ a 4°C por 5 min. Se retiró con cuidado todo residuo líquido que pudo haber quedado adherido a las paredes del tubo. Se secó el tubo en el Savant y resuspendió en amortiguador TE 0.1 M EDTA pH 8.0.

VII.- Obtención de los oligonucleótidos para PCR.

Los oligonucleótidos se obtuvieron de la compañía OPERONTECHNOLOGIES. INC., quienes los fabrica utilizando química de fosforamiditos

VIII.- Preparación y análisis de los oligos que se diseñaron para PCR.

La pastilla seca de los oligonucleótidos se resuspendió en $400 \mu\text{l}$ TE 0.01 M EDTA. Se purificó con *n*-Butanol como descrito por Sawadogo M. y col. (1991), y se resuspendió en $100 \mu\text{l}$ de amortiguador TE 0.01M EDTA. Se midió su concentración a 260 nm de longitud de onda como descrito en Materiales y Métodos VI y se llevó a una concentración de trabajo de $25 \mu\text{M}$ con TE 0.01 mM EDTA pH 8.0. Se guardaron en alícuotas de $50 \mu\text{l}$ a -20°C . La pureza se determinó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 %, 7 M urea, oligonucleótidos de tamaño conocido sirvieron como estándares de peso molecular.

La determinación de la pureza y la concentración del DNA fue típicamente medida por barrido de 230 nm a 300 nm de longitud de onda en un espectro Beckman DU-600. La pureza estuvo determinada por la relación (O.D. a 260 nm)/ (O.D. a 280 nm), la concentración se determinó estimando que 1 O.D. a 260 nm es igual a 50 µg/ml de dsDNA o 33 µg/ml de ssDNA.

IX.- Reacciones de PCR.

El producto de PCR de SRP54 se obtuvo a partir de la siguiente reacción:

70.5 µl de agua tetradesilada estéril.

10 µl de amortiguador de reacción para PCR 10X.

10 µl de dNTP's 2.5 mM (concentración final 200 µM)

1 µl Oligo GMSRP54A 25 µM (concentración final 0.25 µM, 0.35 µg, 1.5×10^{17} moléculas).

1 µl Oligo GMSRP54B 25 µM (concentración final 0.25 µM, 0.35 µg, 1.5×10^{17} moléculas).

7 µl DNA (aproximadamente 38,500 moléculas, 6.24 fg para *S. cerevisiae* (Sambrook J. y col. 1989), 14.4 ng para *E. histolytica* cepa HK9 (Reeves R. E. y col.1971)).

0.5 µl de enzima Taq polimerasa (Boehringer 2.5 Unidades).

Se utilizó el sistema para PCR 9600 GenAmp. con los siguientes ciclos:

1 ciclo Temperatura de desnaturalización 94°C por 90 s.

Temperatura de apareamiento 37°C por 120 s.

Temperatura de polimerización 72°C por 45 s.

20 ciclos Temperatura de desnaturalización 94°C por 30 s.

Temperatura de apareamiento 37°C por 30 s.

- Temperatura de polimerización 72°C por 45 s.
- 10 ciclos Temperatura de desnaturalización 94°C por 30 s.
 Temperatura de apareamiento 55°C por 30 s.
 Temperatura de polimerización 72°C por 45 s.
- 1 ciclo Temperatura de desnaturalización 94°C por 30 s.
 Temperatura de apareamiento 55°C por 30 s.
 Temperatura de polimerización 72°C por 120 s.

X.- Preparación del plásmido pGEM-4Z.

Se llevó a cabo la desfosforilación y purificación del plásmido linearizado pGem-4Z como se describe a continuación (Es importante usar 1 unidad de fosfatasa intestinal de becerro (CIP) por cada 14 pmolas de DNA (relación no publicada de David Adams)).

Se linearizaron aproximadamente 2 µg de plásmido con la enzima de restricción adecuada (en este caso SmaI) y se purificó la banda a partir de un gel de agarosa (TAE 1.2 % en presencia de bromuro de etidio a 0.4 µg/ml concentración final), con "GenClean II" o fenol/cloroformo y precipitación por etanol.

Se resuspendió el pellet de la precipitación y se diluyó el plásmido en 100 µl de buffer CIP (10X = 10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris Cl (pH 8.3)) concentración final 1X (120 µl volumen máximo), y se le añadieron las unidades correctas de la enzima CIP. Se incubó a 37° C por 1 hora, agitándolo de tiempo en tiempo. Se inactivó la enzima calentándola a 68° C 15 min.

Se pasó la solución por una minicolumna Sephadex G-50, previamente equilibrada en TE pH 7.6 y precentrifugada, usando 10 µg de tRNA (de levadura o de timo de vaca) como acarreador. Se volvió a añadir las mismas unidades de enzima del paso 2, y se repitieron los pasos 3 y 4. Se extrajo 2 veces consecutivas con un volumen de fenol/cloroformo (1:1).

Pasando la solución por una minicolumna de Sephadex G-50, previamente equilibrada en TEpH 7.6 y precentrifugada, usando 10 µg de tRNA como acarreador. Se hizo rápidamente una precipitación por etanol, lavando en etanol al 70 % y secando en el Savant. Se resuspendió en 100 µl de H₂O tetradesilada y se calentó a 55° C por 5 min para disolver bien el pellet.

Ligación (este paso es altamente recomendado ya que es la única manera de obtener Ø transformantes sin inserto en una transformación). Se le añadieron 11 µl de buffer de ligación 10X (concentración final 1X), y a continuación 0.5 Unidades de Boehringer T4-DNA-Ligasa por cada 500 ng de DNA. Se incubó a 14° C 10 h. Deteniendo la reacción calentándolo a 68° C 10 min. Se purificó la banda del plásmido que continuó linearizado, a partir de un gel de agarosa (1.2 % TAE en presencia de bromuro de etidio a 0.4 µg/ml concentración final), con "GenClean II" y precipitación por etanol. Se resuspendió en un volumen pequeño de TE y se cuantificó la concentración final.

XI.- Preparación y ligación del producto de PCR SRP54 al plásmido pGEM-4Z.

Se realizó el **relleno de los extremos** del producto de PCR de SRP54 según descrito por Starr L. y col. (1992) de la siguiente manera: el producto de PCR de SRP54 se purificó a partir de la elución de gel de agarosa como descrito en Materiales y Métodos V, resuspendido en 25 µl de agua tetradesilada, 10 µl de amortiguador de pol 10X (Tris 0.5 M pH 7.5, MgCl₂ 0.1 M, DTT 10 mM, BSA 0.5 mg/ml, dNTP's 200 µM), rATP a una concentración final de 1 mM. 10 Unidades de T4 polinucleótido cinasa, 10 Unidades de DNA polimerasa I. Llevándolo a 100 µl con agua tetradesilada e incubándolo a 37° C por 1 h. Se detuvo la reacción con 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se purificó de nuevo por "GenClean II" como descrito anteriormente en Materiales y Métodos VI, y se eluyó en 20 µl de TE 0.01 mM EDTA pH 8.0.

La técnica de **ligación de fragmentos de DNA con extremos rasurados** fue estandarizada de la siguiente manera: se utilizó un amortiguador de reacción que incluía PEG 8000 (Ken'ichiro Hayashi y col. 1986) y Patricia V. King y col. 1986), el amortiguador se

preparó a una concentración stock 5X (Tris HCl 330 mM pH 7.5, MgCl₂ 25 mM, DTE (dithiothreitol) 5 mM, ATP 5 mM, PEG8000 25 %). Además se utilizó una relación de 1 unidad de T4 RNA ligasa por cada unidad de T4 DNA ligasa, se usaron 25 Unidades de T4 DNA ligasa por µg de DNA a ligar (Surgino A. y col. 1977). El producto de PCR de SRP54 fue ligado al plásmido pGem4Z (cortado con SmaI y desfosforilado como descrito), en presencia de 6 Unidades de la enzima de restricción SmaI, (Zheng-gang L. y col. 1992) con el fin de mejorar la eficiencia de ligación del plásmido al producto de PCR. En las reacciones de ligación del plásmido vs el producto de PCR la cantidad de plásmido se mantuvo constante (56.1 ng, 31 fmoles, 1.86×10^{10} moléculas), y la relación del producto se varió en las siguientes relaciones: 1:1, 1:4, 1:7.5 y 1:15 en un volumen total de reacción de 30 µl.

Los 30 µl de la reacción de ligación se diluyeron en 5 volúmenes de amortiguador TE EDTA 0.01 M pH 8.0, y 40 µl (aproximadamente 15 ng de plásmido inicial (concentración correcta a usar según Bercovich J. A. y col. (1992), se usaron para la transformación de células competentes según descrito.

XII.- Preparación y transformación de células competentes.

Preparación de células competentes. Se inculó en 5 ml de LB una colonia de *E. coli* CMK, se creció en agitación 18 h a 37°C. A 500 ml de LB se le agregó el cultivo y se incubó a 37° C en agitación hasta una A de 0.5 a 550 nm de longitud de onda (fue importante que no pasara de esta densidad).

Se centrifugó el cultivo en botellas estériles a 3 krpm, 5 min a 4° C y se resuspendió la pastilla en 250 ml del amortiguador TC, incubándolo en hielo por 1 h.

Se centrifugó a 3 krpm, 5 min a 4° C y se resuspendió la pastilla en amortiguador TCG. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml y se metieron a nitrógeno líquido inmediatamente. Guardándose a -70°C se pudieron descongelar y usar hasta 2 veces cada alícuota.

Transformación de células competentes. En un tubo eppendorf estéril se añadieron 100 μ l de células competentes (obtenidas por el método de calcio como descrito en Métodos), 85 μ l de H₂O tetradesilada y estéril a 4° C 4 μ l de PEG 50 % (filtrado por membrana Millipore 0.45 μ m), 10 μ l amortiguador TCM, 1 μ l de una solución 1 ng/ μ l de DNA. Se incubaron en hielo por 1 h, se incubaron a 25° C por 10 min, se agregaron 800 μ l de LB sin antibiótico y se incubaron 1 h a 37° C. Plaqueando 200 μ l por caja de Petri con LB sólido y antibiótico. Se incubó a 37° C durante la noche. Se contaron, picaron y estiraron las colonias a cajas frescas de LB con antibiótico.

XIII.- Sondeo directo por PCR

Se procedió modificando el método descrito en McPherson M. J., y col. (1992). Las colonias se picaron y cada una se resuspendió en 100 μ l de agua tetradesilada estéril, se calentó a 95° C por 15 min, al terminar se agitó el tubo y se centrifugó para bajar los residuos. Se añadieron 10 μ l de cada solución a tubos con 90 μ l de una solución previamente preparada de manera que las concentraciones finales de los solutos fueran: amortiguador de reacción para PCR 1X, dNTP's a una concentración final de 200 μ M. Oligo GMSP6 concentración final 0.25 μ M (0.16 μ g, 1.5×10^{17} moléculas). Oligo GMT7 concentración final 0.25 μ M (0.16 μ g, 1.5×10^{17} moléculas). 2.5 Unidades de enzima Taq polimerasa (Boehringer). Se realizaron 30 ciclos en donde la temperatura de desnaturalización fue de 94° C por 30 s. La temperatura de apareamiento fue de 37° C por 30 s y la temperatura de polimerización fue de 72° C por 45 s. Las reacciones se analizaron en geles de agarosa TAE1X concentraciones de 0.8 %, 1.2 % o 1.5 %, como descrito en Materiales y Métodos V, dependiendo de los tamaños de las bandas esperadas. En todos los casos se incluyeron controles negativos (colonia CMK sin transformar), y controles positivos (colonias con insertos de tamaño conocido).

XIV.- Secuenciación del inserto de SRP54.

El método de secuenciación se adaptó a partir del método de David F. Barker. (1993), y el método standard del kit de Sequenase (USB INC.) como sigue: a 3 μl del stock 2 μM (6 pmolas) de primer de secuenciación (GMSP6 o GMT7), se le añadieron 1.5 μl de NaOH 1 N. 1.5 μl (2 pmolas) de esta solución se le añadieron a 2.5 μl (aproximadamente 400 ng, 0.18 pmolas) del plásmido de doble cadena con el inserto (purificado previamente por el método de "minipreparación" y concentrado por precipitación por etanol). Se incubó a 37° C por 10 min. Aparte se preparó una solución de apareamiento a la que a 44 μl de agua tetradestilada se le añadió 8 μl de la solución NSA10X y 4 μl de HCl 1 N. Terminada la incubación se le añadió a la reacción 7 μl de la solución de apareamiento y se incubó a 37° C por 5 min. Al terminar la incubación se le añadió a la reacción 1 μl DTT 0.1 M, 2 μl label mix previamente diluida 1:5, 6 μCi de $\alpha\text{-P}^3\text{3dATP}$ (máximo 3 μl), 2 μl de la enzima sequenasa previamente diluida 1:8 en el amortiguador de sequenasa.

Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se preparaban previamente 4 tubos cada uno con 1 μl de una de las soluciones de terminación (G,A,T o C; cada solución contenía una concentración de 80 μM de cada uno de los nucleótidos y además 8 μM de un análogo no extendible (dideoxinucleótido) de uno de ellos) y 1.5 μl de mezcla de extensión, se equilibraron los tubos a 37° C. Una vez terminada la incubación se le añadieron 3.5 μl de ésta a cada uno de los tubos con la solución de terminación (la concentración de Na es de 40 mM, lo óptimo recomendado para la reacción de secuenciación). Se incubó 5 min. a 45° C y se termino la reacción con 4 μl de la solución de carga para geles de acrilamida.

Se calentaron las muestras 2 min a 95° C y se pusieron en hielo. Se cargaron en un gel de secuenciación previamente precorrido durante 45 min a 80 W, 3 o 4 μl de cada una de las reacciones en carriles continuos, marcados G,A,T y C. Se corrieron las muestras a 70 W y 1600 V.

Al terminar los tiempos se desmonto el gel de la cámara de electroforesis y se transfirió a

un filtró de papel Whatman. Se secó una hora a 80° C en un desecador de geles. Se expuso ante un film X-OMAT (Kodak) durante 16 h en un cassette de exposición. Y finalmente se reveló la placa exponiéndola a los reactivos convencionales (revelador, fijador, agua). Se analizó la secuencia obtenida.

XV.- Análisis de las secuencias.

Para el análisis de los primers y de las secuencias obtenidas por el método de secuenciación, se utilizaron principalmente el paquete de análisis GCG de la universidad de Wisconsin y el paquete GeneWorks de Intelligenetics INC. para Macintosh.

FASTA.- Busca secuencias similares a la secuencia en cuestión en los bancos de datos de secuencias nucleotídicas.

TFASTA.- Busca secuencias similares a la secuencia en cuestión en los bancos de datos de secuencias peptídicas.

CODONPREFERENCE.- Reconoce secuencias que codifican para un péptido en virtud de la semejanza que presenta la secuencia nucleotídica con el uso de codones de la especie en cuestión.

ALIGNMENT.- Alinea las secuencias de acuerdo a los motivos mas parecidos entre ellas.

RESULTADOS.

I.- Diseño y análisis de los oligos.

El diseño de los oligos (Figura 4), se basó en los siguientes criterios:

A.- Se **alinearon** las secuencias de aminoácidos reportadas para SRP54 de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Canis lupus* y el homólogo *ftt* de SRP54 en *Escherichia coli*. Con esto se pretendió abarcar todo lo largo de la escala filogenética para diseñar los oligos a partir de los aminoácidos conservados en éstas, además se tomó en cuenta en el diseño el que los oligos discriminaran otras proteínas de la familia que unen moléculas de GTP. Se encontraron dos regiones con aminoácidos conservados lo suficientemente cercanos entre si para hacer posible el diseño de dos oligos. Al oligo homólogo y en sentido a la hebra de DNA original, se le denominó **GMSRP54A**. Y al oligo homólogo a la hebra complementaria y en antisentido, se le denominó **GMSRP54B**.

B.- El **tamaño** de cada oligo fue de 20 nucleótidos para lograr una alta especificidad (Randall K. Saiki y col. 1988).

C.- El grado de **degeneración** de cada oligo no excedió el máximo recomendado para PCR que es de 1,024, como sugerido en Innis M. A., y col. 1990. El uso de codones degenerados tomó en cuenta el uso preferencial de *Entamoeba histolytica* como descrito en Tannich y col. (1992), que usa preferencialmente una "A" o una "T" en la tercera posición.

D.- Se diseñaron los oligos de manera que su **t_m** (temperatura a la que la mitad de las moléculas se encuentran acopladas a su blanco), fuera lo mas elevada posible con el fin de evitar hibridizaciones inespecificas. Se uso el criterio de cálculo de Catrine A. y col. (1988), para determinar ésta. Para **GMSRP54A** su t_m fue de 46°C, para **GMSRP54B**

a)

		GMSRP54A	
ffh	VVLMAGLQQAQKTTISVGLGKFLREKHKKVVVVSADVYRPAALIKQLETLEQVGVDFPP		161
SRP54 SC	IIMFVGLQSSGKTTTSCTKLAVYYSKRGFKVGLV-CADTFPRAGAPDOLKQNAIRARIPFFYG		169
SRP54 SP	VIMMVLQSSGKTTTCSKLAALHYQRRLKSCIV-AAATFRAGAPDOLKQNAIKARVYFYG		161
SRP54 MAM	VIMFVGLQSSGKTTTCSKLAAYYQRKGVTKTCL-CADTFPRAGAPDOLKQNAIKARIPFFYG		161
ffh	<u>SDVGGKFDVIDVNAALKEAKLKPFDVLLVDTACRLHVDEAMMDEIKQVHASINIVETIFVV</u>		221
SRP54 SC	SYTETDEAKVAEGINKPKKEKFDIIIVDTSGRHHQEEELFQEMIEISNVIKRNQTIMVL		229
SRP54 SP	SYTETDVFVIAKEGVDFKFNDRFDVIIIVDTSGRHHQEEELFAEMVEISDAIRPDQTIMIL		221
SRP54 MAM	SYTEMDFVIIASEGVEKPKNENPEIIIIIVDTSGRHHQEDSLFEERLQVSNATQPDNIYVVV		221
ffh	<u>DAMTSGDAANTAFAFNEALPLTGVVLEKVDGDAKGGAL</u>		260
SRP54 SC	<u>DASIQCAAEQSKAFKESSDPFGAIIILKMDGHAKEGGAL</u>		268
SRP54 SP	<u>DASIQCAAEQSQAFAKETADFGAVIITKLDGHAKEGGAL</u>		260
SRP54 MAM	<u>DASIQCAACEAQAFAFKDKVDVASVIVTKLDGHAKEGGAL</u>		260
		GMSRP54B	

b)

-Primer GMSRP54A

5' -GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCAAGGIIISHGGIAAIAACHAC-3'

Tamaño: 43amero. Tamaño del primer vs SRP54: 20amero. Rango de TM: 46-60° C.	Degeneración: 432 ΔG de la estructura secundaria: -1.4 No existe asociación entre primers.
--	--

-Primer GMSRP54B

5' -ATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCICCHYIIGCITSICCRTC-3'

Tamaño: 42amero. Tamaño del primer vs SRP54: 20amero. Rango de TM: 50-65° C.	Degeneración: 768 ΔG de la estructura secundaria: -0.7 No existe asociación terciaria entre primers.
--	--

-Primer GMSP6

5' -GGATTTAGGTGACACTATAG-3'

Tamaño: 20amero. TM: 46° C. No existe estructura secundaria ni asociación entre primers.
--

-Primer GMT7

5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Tamaño: 20amero. TM: 50° C. No existe estructura secundaria ni asociación entre primers.
--

Figura 5.- a) Diseño de los oligos a partir de un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SRP54. De *E. coli* (ffh), *S. cerevisiae* (SC), *S. pombe* (SP) y *C. lupus* (MAM). Las flechas muestran la región sobre la que se diseñaron los oligos, y su dirección 5' - 3'. b) Oligonucleótidos usados como primers, mostrando sus características en los recuadros. Las regiones subrayadas son las regiones específicas para SRP54, la región en volumen es homóloga a pGem-4Z.

su tm fue de 50°C.

E.- Los últimos nucleótidos en 3' para ambos oligos fueron C y se diseñaron para que no estuvieran degenerados con el fin de asegurar la correcta iniciación de la polimerización.

F.- El programa MuFold citado en Michael Z. (1989), sugiere que no formaran estructuras secundarias ni se asocian entre ellos.

G.- En el diseño de los oligos se utilizaron además nucleótidos de Inosina (I), para algunos de los sitios degenerados por los nucleótidos A,T,G "o" C, pues el primero se une específicamente a los segundos, y por lo tanto su utilización aumenta el rendimiento de productos de PCR, ya que un mayor número de oligos se unen al DNA (Patil R.V. y col. 1990 y Knoth K. y col. 1988). Se tuvo cuidado de no poner I en posiciones cercanas a los extremos 3' para evitar inespecificidades de iniciación

H.- Los oligos además incluyen en el extremo 5' una región homóloga a partes de la secuencia del plásmido pGem-4Z, pues en la estrategia original se iban a clonar los productos de PCR por el método descrito por Shuldiner R. A., y col. (1991).

I.- Se analizaron los oligos por FASTA y TFASTA, para determinar si existía algún tipo de pegado inesperado de estos primers en las secuencias reportadas hasta el momento del GenBank y Swissprot. Este análisis reveló que, en relación a todas las secuencias reportadas en estos bancos de datos, la combinación de ambos oligos es específica para la amplificación de una región de aproximadamente 440 pb dentro de los genes para SRP54 de diferentes especies.

Otro oligo fue diseñado homólogo a la hebra sentido de la región Sp6 de los plásmidos pGem de Promega, de modo que sirviera como oligo de secuenciación, y sondeo por PCR de los insertos dentro del sitio de múltiple clonación, se le denominó GMSP6. El oligo antisentido

su tm fue de 50°C.

E.- Los últimos nucleótidos en 3' para ambos oligos fueron C y se diseñaron para que no estuvieran degenerados con el fin de asegurar la correcta iniciación de la polimerización.

F.- El programa MuFold citado en Michael Z. (1989), sugiere que no formaran estructuras secundarias ni se asocian entre ellos.

G.- En el diseño de los oligos se utilizaron además nucleótidos de Inosina (I), para algunos de los sitios degenerados por los nucleótidos A,T,G "o" C, pues el primero se une específicamente a los segundos, y por lo tanto su utilización aumenta el rendimiento de productos de PCR, ya que un mayor número de oligos se unen al DNA (Patil R. V. y col. 1990 y Knoth K. y col. 1988). Se tuvo cuidado de no poner I en posiciones cercanas a los extremos 3' para evitar inespecificidades de iniciación

H.- Los oligos además incluyen en el extremo 5' una región homóloga a partes de la secuencia del plásmido pGem-4Z, pues en la estrategia original se iban a clonar los productos de PCR por el método descrito por Shuldiner R. A., y col. (1991).

I.- Se analizaron los oligos por FASTA y TFASTA, para determinar si existía algún tipo de pegado inesperado de estos primers en las secuencias reportadas hasta el momento del GenBank y Swissprot. Este análisis reveló que, en relación a todas las secuencias reportadas en estos bancos de datos, la combinación de ambos oligos es específica para la amplificación de una región de aproximadamente 440 pb dentro de los genes para SRP54 de diferentes especies.

Otro oligo fue diseñado homólogo a la hebra sentido de la región Sp6 de los plásmidos pGem de Promega, de modo que sirviera como oligo de secuenciación, y sondeo por PCR de los insertos dentro del sitio de múltiple clonación, se le denominó GMSP6. El oligo antisentido

homólogo a la hebra complementaria de la región T7 de los plásmidos pGem de promega, fue obtenida de la M. en C Helena Porta y se le denominó GMT7 (las características de los oligos se resumen en la Figura 5).

El análisis de los oligos GMSRP54A, GMSRP54B, GMT7 y GMSP6 en geles resolutivos de 20 % acrilamida, 7 M urea mostraron únicamente los oligos del tamaño esperado (los datos no se muestran).

II.- Obtención y resolución del producto PCRSRP54 de *Entamoeba histolytica*

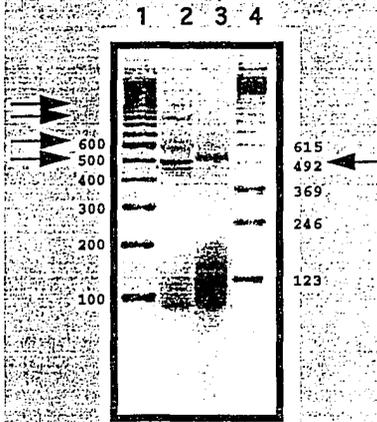
La reacción de PCR se llevó a cabo, como se describe en Materiales y Métodos, para el DNA de *E. histolytica* cepa HK9 y para el DNA de *S. cerevisiae* usado este último como control positivo de la reacción.

En el gel resolutivo de agarosa NuSieve GTG al 4 % se observan múltiples productos de PCR para la reacción donde se uso el DNA de *S. cerevisiae* (tal vez mas adelante, depurando la reacción de PCR se pueda obtener un solo producto de PCR, pero en este caso no era uno de los fines a lograr). Un solo producto predominante del tamaño esperado (aproximadamente 500 pb), para la reacción de PCR donde se uso el DNA de *E. histolytica* cepa HK9 (Figura 6a). Este resultado fue varias veces reproducible, por lo que se decidió proseguir con la purificación y la clonación de este producto de PCR al que se denominó PCRSRP54.

III.- Clonación del producto PCRSRP54 de *Entamoeba histolytica*.

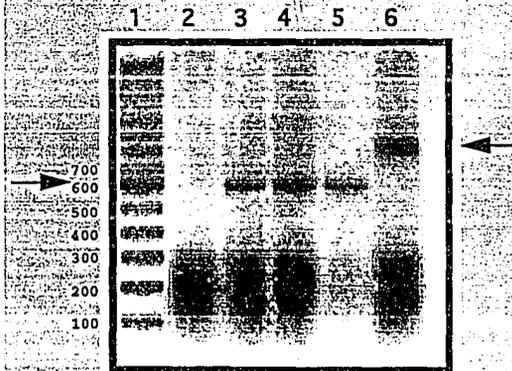
Actualmente es frecuente el clonar los productos de PCR para su posterior caracterización por secuenciación, pues durante la reacción de PCR frecuentemente ocurren errores en la replicación (Randall K. Saiki y col. 1988), y también ocurre recombinación durante el PCR de los productos de PCR en los casos en que se trabaja con dominios compartidos por varias familias diferentes o genes multigénicos (Meyerhans A. y col. 1990). El clonar los productos de PCR sirve para resolver las discrepancias y las

A) Productos de PCR usando los primers GMSRP54A y GMSRP54B.



- 1.- MPM "ladder 100".
- 2.- Productos obtenidos usando DNA de *S. cerevisiae*.
- 3.- Producto obtenido usando DNA de *E. histolytica*.
- 4.- MPM "ladder 123".

B) Sondeo por PCR de las bacterias transformadas usando los primers GMT7 y GMSP6.



- 1.- MPM "ladder 100".
- 2.- Control (-) CMK sin transformar.
- 3.- Clona 41.
- 4.- Clona 44.
- 5.- Clona 45.
- 6.- Control (+) CMK con plásmido de inserto conocido (>800).

Figura 6.- Se muestra el análisis por gel de agarosa de los diferentes productos de PCR. Las flechas indican los productos observados.

inespecificidades de lectura que surgen durante la reacción de secuenciación de la mezcla heterogénea de los productos de PCR.

Sin embargo puede ser difícil clonar productos de PCR debido a que la enzima Taq pol inserta generalmente una A en el extremo 3' (Clark M. J. 1988), impidiendo la ligación por extremos rasurados. Y el diseño de primers con sitios de restricción también ha probado ser ineficaz (Kaufman D. L. y col. 1990), debido a que las enzimas de restricción necesitan un tamaño mínimo hacia los extremos del DNA, para cortar eficientemente sus blancos.

En un principio se intentó clonar el producto PCRSRP54 por el método de clonación por PCR libre de ligasa (Shuldiner R. A. y col. 1991), este método consiste en amplificar el producto de PCR previo junto con el plásmido, de tal manera que al final este queda inserto durante la amplificación. Pero varios intentos, algunos con modificaciones técnicas para depurarlo, resultaron infructuosos. Por lo que se procedió a ligar el producto al plásmido pGem-4Z como se describe en Materiales y Métodos X (resumido gráficamente en la Figura 7) y transformar el plásmido con el inserto a las bacterias *E. coli* de la cepa CMK como ya se describió.

Como se describe en los Métodos se usaron varias relaciones molares de inserto : plásmido, y la que mejor resultado fue la relación inserto a plásmido (15:1) donde se obtuvo una eficiencia de transformación = 1.44×10^3 colonias/ μ g de plásmido = eficiencia 8% superior a la del blanco.

IV.- Resultado del sondeo para encontrar clonas que tuvieran el plásmido con el inserto del producto PCRSRP54.

En el sondeo por PCR con los oligos GMSP6 y GMT7 de las colonias obtenidas de la relación (15:1), se encontraron 3 colonias (el 23 %), que mostraron tener el inserto del tamaño esperado aproximadamente 620 pb (Figura 6b). Se denominaron clona 41, clona 44, clona 45.

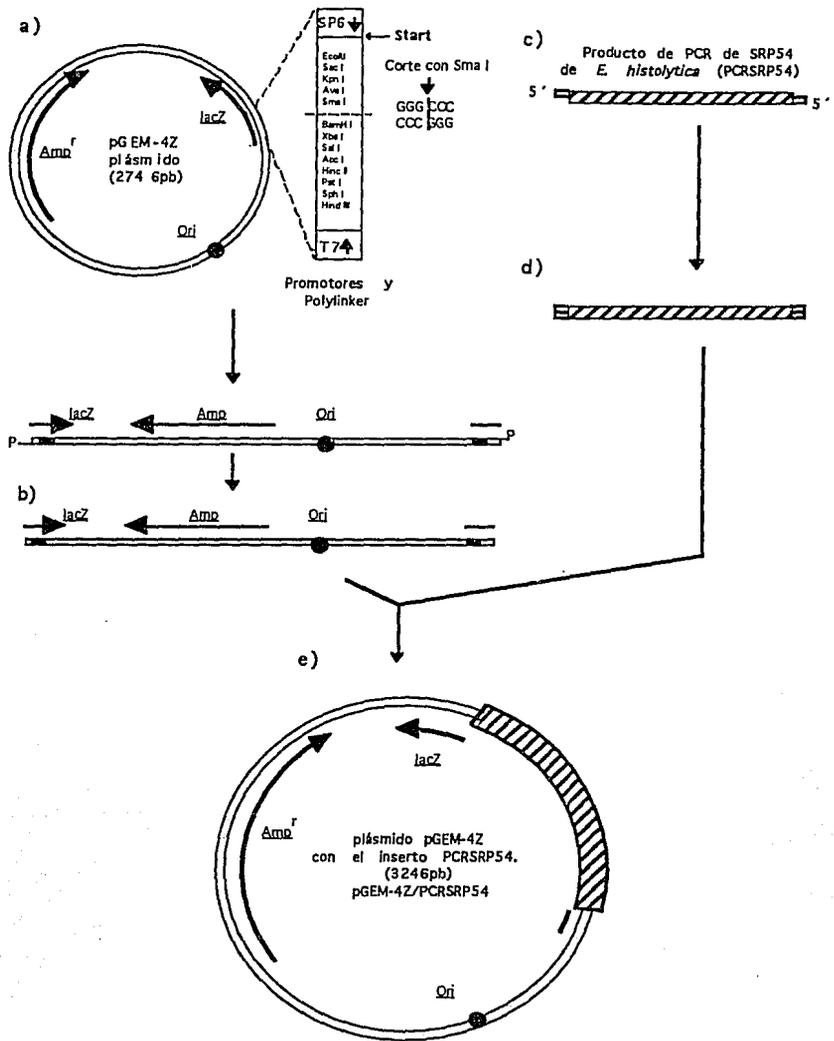


Figura 7.- Se muestra graficamente la estrategia de clonación. a) El plásmido pGEM-4Z se digirió en su sitio unico Sma I. b) El plásmido ya linearizado se desfosforila y se purifica por gel. c) El producto de PCR de SRP54 (PCRSRP54) se purifica de gel por "GenClean" y sus extremos se "rellenan" con pol I y T4 quinasa. El PCRSRP54 se vuelve a purificar por "GenClean". d) El PCRSRP54 se liga al plásmido pGEM-4Z en presencia de DNA ligasa, RNA ligasa y Sma I. e) Obteniendo la construcción esperada de aproximadamente 3246pb.

Se aseguró cada transformante plaqueándola a cajas frescas y guardándola a 4.0° C. También se realizaron preparaciones en glicerol al 25 % de cada transformante y se guardaron a -70° C. Se hicieron sondeos posteriores por PCR de las preparaciones y de los cultivos de cada transformante para asegurar que retuvieran el plásmido con su inserto, en este caso el ensayo fue positivo para todas las transformantes.

V.- Secuenciación y análisis del inserto de la Clona 41.

La clona 41 se secuenció como se describe en Materiales y Métodos. El contingente de las diferentes lecturas y la secuencia obtenida a partir de éste se resumen en la Figura 8.

El análisis de la secuencia por **CodonPreference** para buscar marcos de lectura abierta indicó que un marco de lectura abierta continua empezaba a partir del primer nucleótido de la secuencia (Figura 9). La traducción deducida de aminoácidos de éste marco de lectura se muestra debajo de la secuencia de la Figura 8.

El análisis de la composición (67 % de uso para el par A-T (un cociente de 122/372), contra el 67 % esperado para *E. histolytica* (Char S. y col. 1992)), y del uso de codones (Tannich E. y col. 1992), a partir del programa **CodonPreference** del paquete de análisis **GCG** (Figura 9), y el cociente de los aminoácidos más representados de la secuencia peptídica deducida de la secuencia de la clona 41 (Tabla I), sugieren fuertemente que la secuencia nucleotídica del inserto de la clona 41 pertenece a *Entamoeba histolytica*.

Tanto la secuencia nucleotídica obtenida como el péptido deducido de cada uno de sus marcos de lectura posible se utilizaron para la búsqueda de secuencias homólogas en los bancos de datos. Como se muestra en la Tabla II, la mayor homología de la secuencia nucleotídica fue para con otros genes que codifican para SRP54. El marco de lectura que mostró tener la más alta homología significativa con otras de las secuencias reportadas fue de nuevo el marco de lectura que empieza a partir del primer nucleótido de la secuencia y su

homología mas alta fue con proteínas SRP54 reportadas de otras especies, especialmente entre aquellas reportadas para eucariotas como esperado.

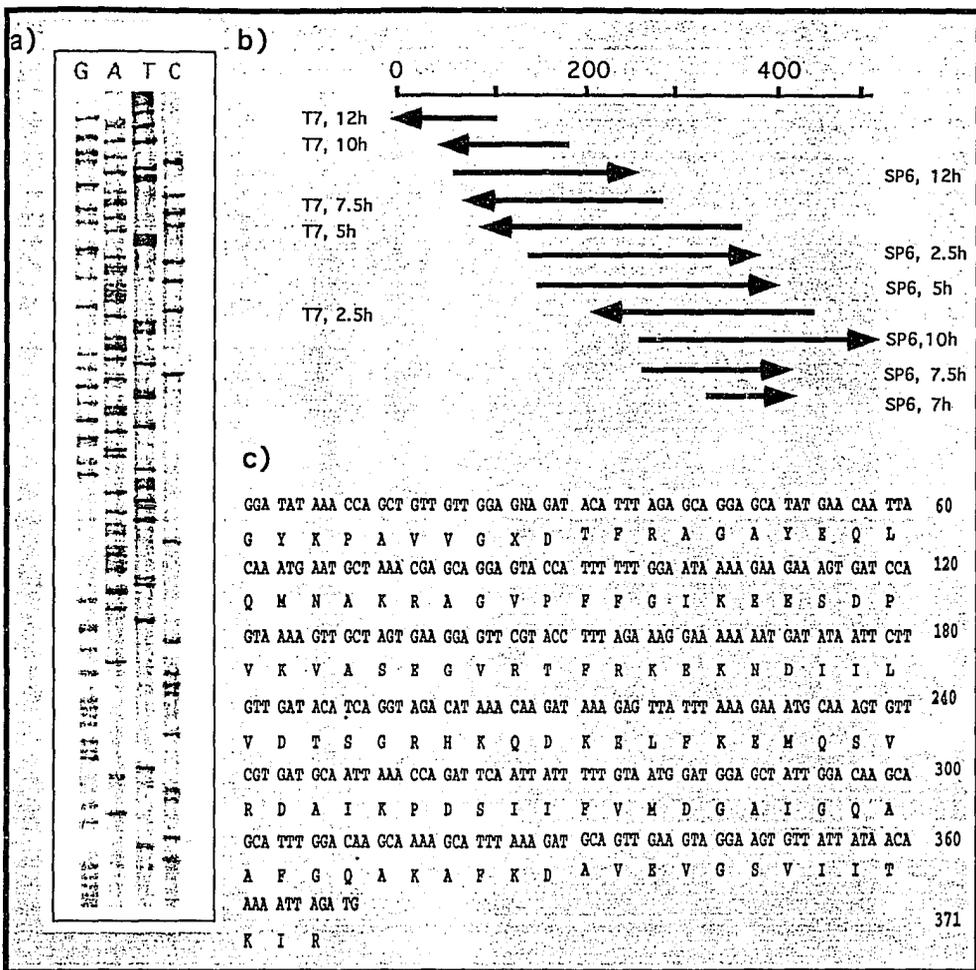
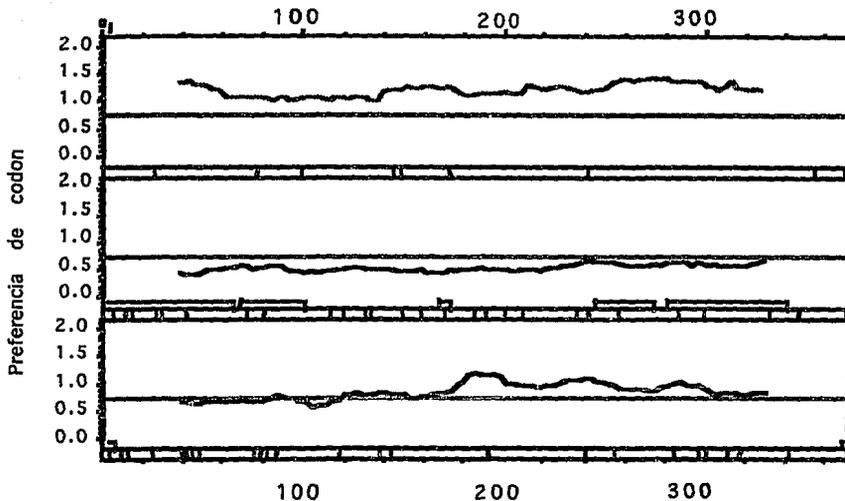


Figura 8.- a) Ejemplo del gel de secuencia obtenido con el método usado para la secuenciación del DNA de doble cadena. b) Contingente de los diferentes tiempos de electroforesis usados para la resolución de la secuencia de la clona 41 usando los oligos T7 y Sp6 como primers para la reacción de secuenciación. c) Secuencia obtenida del consenso de las lecturas y su traducción deducida de aminoácidos para su marco de lectura más probable.

Preferencia de codones de la secuencia de la clona 41



Promedio del uso preferencial de codones para el marco 1 = 1.2299

Promedio del uso preferencial de codones para el marco 2 = 0.5590

Promedio del uso preferencial de codones para el marco 3 = 0.8277

Promedio del uso preferencial de codones para una secuencia al azar = 0.719

Umbral de codon poco usado: 0.1

Figura 9.- Gráfica del análisis del uso preferencial de codones de la secuencia obtenida de la clona 41. Se muestra que el marco de lectura 1 (primer panel, línea amarilla), tiene un marco de lectura abierta (cuadro en rojo), utilizando preferentemente (123%), el uso de codones para amiba (El umbral mínimo de preferencia es la línea azul), y pocos codones irregulares (líneas verticales en verde).

Aminoácido	Codon	Cociente	% observado	% <i>E. histo</i>	% <i>E. coli</i>	% <i>S. cere</i>	% <i>H. sapiens</i>
Glutamina	GGA	7/8	88	<u>72</u>	14	02	14
Aspartico	GAT	9/9	100	<u>89</u>	<u>74</u>	48	25
Lisina	GT(A/T)	10/10	100	<u>87</u>	<u>63</u>	<u>59</u>	12
Alanina	GC(A/T)	9/9	100	<u>95</u>	<u>77</u>	<u>71</u>	30
Valina	AAA	11/12	92	<u>72</u>	33	22	18
Glicina	CAA	4/6	67	<u>95</u>	00	<u>95</u>	12

Tabla I.- En la tabla se muestran algunos aminoácidos con sus codones que son representativos del uso preferencial de codones para amiba. El cociente muestra el número de esos aminoácidos encontrados en la secuencia de la clona 41 que usan estos codones, El % observado es la traducción porcentual del cociente. Los % de *E. histolytica*, *E. coli*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* se muestran para comparación con los datos encontrados. Los porcentajes subrayados son los de mayor homología con lo observado.

a) Análisis de la secuencia nucleotídica.

lugar	FASTA GCG XINUMAC	RESULTADOS
1.-	Mouse SRP54	65.0% de identidad en un sobrelape de 343 pb
2.-	S. cerevise SRP54	62.1% de identidad en un sobrelape de 367 pb
3.-	SRH1 (SRP54 hom.)	62.1% de identidad en un sobrelape de 367 pb
4.-	S. pombe SRP54	60.9% de identidad en un sobrelape de 371 pb
5.-	Dog SRP54	66.2% de identidad en un sobrelape de 349 pb
6.-	Mycoplasma SRP54	58.7% de identidad en un sobrelape de 358 pb

b) Análisis de la secuencia peptídica de su marco de lectura mas probable.

lugar	TFASTA GCG XINUMAC	RESULTADOS
1.-	Dog SRP54	57.2% identidad en 123 aa de sobrelape
2.-	Mouse SRP54	56.9% identidad en 123 aa de sobrelape
3.-	S. pombe SRP54	53.7% identidad en 123 aa de sobrelape
4.-	S. cerevise SRP54	54.5% identidad en 123 aa de sobrelape
5.-	SRH1 (SRP54 hom.)	54.9% identidad en 122 aa de sobrelape
6.-	trmD Operon.	34.2% identidad en 120 aa de sobrelape
7.-	Mycoplasma SRP54	31.7% identidad en 120 aa de sobrelape
8.-	S. solfataricus Docking pro	35.0% identidad en 117 aa de sobrelape
9.-	S. cerevise SRP receptor	37.8% identidad en 74 aa de sobrelape

Tabla II.- Resultados del análisis de la búsqueda de homologías en los bancos de datos del paquete GCG de la universidad de Wisconsin y del IBT para a) la secuencia nucleotídica de la clona 41 y b) la secuencia peptídica del marco de lectura más probable de esta secuencia.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

1.- Hemos aprovechado la técnica de amplificación de secuencias específicas por el método PCR para el diseño de unos primers que amplificaron una secuencia de aproximadamente 490 pb del gene SRP54 de *Entamoeba histolytica*.

a) Inexplicablemente para nosotros, con nuestro control positivo (DNA de *S. cerevisiae* como templado para la reacción de PCR), se obtuvieron varios productos de diferentes tamaños, entre ellos uno que podría pertenecer a SRP54.

b) Sin embargo para la reacción de PCR usando diferentes purificaciones de DNA de *E. histolytica* como templado, se obtuvo reproduciblemente un producto predominante de PCR con el tamaño esperado para la amplificación con los primers diseñados. Asimismo los controles negativos (reacciones sin templado), fueron constantemente negativos, por lo que el producto PCRSRP54 no pudo ser el resultado de una contaminación.

2.- Los datos anteriores justificaron el que se clonara el producto para su análisis por secuenciación.

3.- Los análisis de la secuencia mostraron lo siguiente :

a) La secuencia mostró tener una alta homología, tanto en su secuencia nucleotídica como en su traducción a la secuencia peptídica, con las secuencias de SRP54 reportadas para otros organismos.

b) El mayor porcentaje de identidad de la secuencia de la clona 41 fue para con su región homóloga de SRP54 en *Canis lupus* y en segundo lugar para su región homóloga de SRP54 en *S. cerevisiae*. Un porcentaje de identidad mucho menor se encontró para con su región homóloga de fth en *E. coli* (no se muestra el dato). Este resultado i de acuerdo con

el hecho esperado en el que se sitúa a *E. histolytica* dentro del grupo de los organismos eucariotas.

c) La secuencia peptídica de la región denominada "caja II", que se encuentra ultraconservada a lo largo de toda la escala filogenética, en la secuencia de la clona 41 se encuentra 100 % conservada (Figura 10).

d) Los análisis de composición y del uso de codones se parecen a lo reportado para *E. histolytica*, lo que sugieren fuertemente que en realidad la secuencia clonada y secuenciada pertenece a *E. histolytica*.

e) De manera interesante alineaciones de la secuencia de la clona 41, con las regiones homólogas de otros organismos (Figura 11), revelan que la secuencia tiene una inserción de 9 pb en la región 146-154 pb, y una delección de 9 pb (manteniendo siempre el marco de lectura), en la región aledaña 174-183. Se diseñó un oligonucleótido homólogo a la última región para determinar (por ensayos posteriores) si esta región es específica para SRP54 de *E. histolytica*, y si lo es determinar el significado que esto pueda tener. De ser ciertos estos datos esta región puede ser un posible blanco para el diseño de drogas específicas contra *E. histolytica*.

f) Es de notar que la secuencias nucleotídica de la clona 41 tiene una mayor homología con la secuencia homóloga de otras especies que la de su secuencia peptídica con las mismas especies, por ejemplo la homología de la secuencia nucleotídica de la clona 41 contra su homólogo de Can (DOGSRP54) es de 66.2% contra 57.2% que es la homología de la secuencia peptídica contra su homóloga de la misma especie. Esto no parece ser una particularidad de esta proteína, ya que el análisis de secuencias nucleotídicas y peptídicas de otras proteínas de ameba (Actina- α , Ras, Cistein Proteasa 1, Dehidrogenasa, F. Glicoproteína 1), contra sus homólogas de especies eucariotas superiores muestran el mismo resultado. Esto nos indica que algunas proteínas incluyendo SRP54 por su variabilidad no son buenos relojes biológicos para el estudio de filogenias como en cambio lo

SECUENCIA 41	-----	---GYKPAVV	GXDTRFRAGAY	17		
PROT SRP54 DOG	FVGLQGSGKT	TTCCKLAYYY	QRKGWRTCLI	CADTFRAGAF	40	
PROT SRP54 SP	MVGLQSGSKT	TTCCKLALHY	QRRLKSKCLV	AADTFRAGAF	40	
SECUENCIA 41	EQLQMNAKRA	GVPFFGIKEE	SDPVKVASEG	VRTFRKEKND	57	
PROT SRP54 DOG	DQLKQNAIKA	RIPFYGSYTE	MDPVIIASEG	VEKFKNFENFE	80	
PROT SRP54 SP	DQLKQNAIKA	RVYPFGSYTE	TDPVVIASEG	VDKFKNDRFD	80	
SECUENCIA 41	IIL	VDTSGRH	KQDKELFKEM	QSVRDAIKPD	SIIFVMDGAI	97
PROT SRP54 DOG	III	VDTSGRH	KQEDSLFEEM	LQVANAIQPD	NIVYVMDASI	120
PROT SRP54 SP	VII	VDTSGRH	QQEQELFAEM	VEISDAIRPD	QTIMILDASI	120
SECUENCIA 41	GQAAFGQAKA	FKDAVEVGSV	IITKIR----	-----	123	
PROT SRP54 DOG	GQACEAQAKA	FKDKVDVASV	IVTKLDGHAK	GGGALSAAVA	160	
PROT SRP54 SP	GQAAESQSKA	FKETADFGAV	IITKLDGHAK	GGGALSAAVA	160	

Figura 10.- Alineamiento de la traducción para aminoácidos del marco de lectura mas probable de la secuencia de la clona 41, con las regiones homólogas de las secuencias para SR54 de *C. lupus* (SRP54 DOG) y *S. pombe* (SRP54 SP). Los aminoácidos homólogos se muestran en azul; la caja II que une GTP y que se encuentra ultraconservada entre los SRP54 de las diferentes especies se muestra dentro de una caja.

SECUENCIA 41	-----	-----	-----	--GGATATAA	ACCAGCTGTT	18
DOGSRP54	GTTCAAAGTT	AGCATATTAT	TACCAGAGGA	AAGGTGGAA	GACCTGTTTG	50
SPSRP54	GCTCAAAGCT	TGCTCTGCAC	TACCAAAGGA	GAGGTTTGA	ATCGTGTTTG	50
SECUENCIA 41	GTGGAGNAG	ATACATTTAG	AGCAGGAACA	TATGAACAAT	TACAAATGAA	68
DOGSRP54	ATATGTGCAG	ACACATTTCAG	AGCAGGACCT	TTTGAOCAA	TAAACAGAA	100
SPSRP54	GTTCGTGCCG	ATACTTTCCG	AGCTGCTCCT	TTTGTCAAT	TAAAGCAGAA	100
SECUENCIA 41	TGCTAAACGA	GCAGGAGTAC	CAITTTTTGG	AATAAAAGAA	GAAAGTGATC	118
DOGSRP54	TGCTACCAA	GCAAGAAATC	CATTCATGG	AGCTATACA	GAAATGGATC	150
SPSRP54	TGCTATCAA	GCAAGTGTTC	CTTACTTTGG	TAGTTACACC	GAGACTGACC	150
GMDif54						
SECUENCIA 41	CAGTAAAAGT	TGCTAGTGAA	GGAGTCTGTA	CCTTTAGAAA	GGAAAAAAT	168
DOGSRP54	CTGTATCAT	TGCTCTGAA	GGAGTG-G-	-----AG-AA	ATTCAAAAAT	191
SPSRP54	CAGTCGTTAT	TGCCAAGGAA	GGTGT-T-G-	-----AT-AA	GTTCAAAAAC	191
SECUENCIA 41	GATA-----	---TAATCT	TGTTGATACA	TCAAGTAGAC	ATAAACAGAA	209
DOGSRP54	GAAAAITTTG	AAAATTATAT	TGTTGATACA	AGTGCAGCCG	ATAAACAGGA	241
SPSRP54	GATAGATTTG	ACGTTATCAT	CGTTGATACA	TCTGTAGGCG	ATCAGCAGGA	241
SECUENCIA 41	TAAAGAGTTA	TTTAAAGGAA	TCCAAAGTGT	TCGTGATGCA	ATTAAACAG	259
DOGSRP54	AGACTCTTTG	TTTGAAGAAA	TGCTTCAAGT	TGCTAACCGT	ATACAAOCTG	291
SPSRP54	GCAGGAGTTG	TTTGCTTAGA	TGCTGGAAT	TTCAGACCGT	ATTCGCCAG	291
SECUENCIA 41	ATTCAATTAT	TTTTG-TAAT	GGATGAGCT	ATTAGACAAG	CAGCATTTGG	308
DOGSRP54	ATAACATTGT	TTATG-TGAT	GGATGCCCTC	ATTGGCAGG	CTTGTGAGCC	340
SPSRP54	ATCA-AACAA	TTATGATTTT	AGARDCTAGC	ATTGGTCAAG	CTGCCGAATC	340
GMEsp54						
SECUENCIA 41	ACAA-GCAA	AGCATTTTAA	GATGCAGTTC	AAGTAGGAAG	TGTTATTTATA	357
DOGSRP54	CC-AGCCAAA	GGCTTTTTAAA	GATAAAGTAG	ATGTACCTTC	GGTAATAGTG	389
SPSRP54	TAAAGCAA	-GGTTTTAAA	GAGACTCTGC	ACTTTGCGCC	TSTAAATAATC	389
SECUENCIA 41	ACAAAAATTA	GATG-----	-----	-----	-----	371
DOGSRP54	AT-AAAACT	GATGGCCATG	CAAAAGGAGG	TGGTGCACTC	AGTGCAAGTT	437
SPSRP54	AC-AAAAATG	GACGGACATG	CAAAAGGTGG	TGGTGCCTTA	TCCGCCGTG	437

Figura 11.- Alineamiento de la secuencia de la clona 41 con las regiones homologas de los genes para las 3 secuencias para SRP54 de *C. lupus* (DOGSRP54) y *S. pombe* SRP54 (SPSRP54). Los nucleótidos homólogos se muestran en verde, la región de inserción y deleción se muestra en azul. Los nuevos oligos diseñados (que se discuten en las conclusiones), se muestran sobre sus regiones de homología.

son Ubiquitina y HSP70.

4.- Considerando los siguientes hechos :

- a) El que hayamos encontrado una secuencia con homología a la proteína SRP54 en el genoma de *E. histolytica*.
- b) El que esta secuencia posea una homología significativa con los genes que codifican para la misma proteína en otros organismos (lo que podría considerarse como un indicativo de que esta proteína se encuentra funcionalmente activa en *E. histolytica*).
- c) El que esta proteína y su actividad junto con los homólogos del 7SL se encuentren ampliamente distribuidos a lo largo de la escala filogenética, incluso en el organismo *T. Brucei* (Michaeli S. y col. 1992), organismo evolutivamente cercano a *E. histolytica*.
- d) El que posiblemente *E. histolytica* contenga un RNA homólogo al RNA 7SL del SRP (datos de nuestro laboratorio no publicados).

Dado los datos anteriores, de manera preliminar se puede suponer que es muy probable que *E. histolytica* posea un complejo funcional SRP o parecido a SRP que cumple la función de direccionar proteínas con secuencias peptídicas parecidas a las secuencias señal hacia alguna membrana. Esta membrana podría ser:

- a) La membrana plasmática de la ameba como sucede en el caso de la bacteria *E. coli*.
- b) La membrana de un retículo endoplasmático aun no identificado en *E. histolytica*, como en el caso del organismo *Giardia lamblia* donde se encontró por técnicas de inmunodetección un retículo rugoso que había escapado a la detección microscópica (Gillin F. D. y col. 1991).

son Ubiquitina y HSP70.

4.- Considerando los siguientes hechos :

a) El que hayamos encontrado una secuencia con homología a la proteína SRP54 en el genoma de *E. histolytica*.

b) El que esta secuencia posea una homología significativa con los genes que codifican para la misma proteína en otros organismos (lo que podría considerarse como un indicativo de que esta proteína se encuentra funcionalmente activa en *E. histolytica*).

c) El que esta proteína y su actividad junto con los homólogos del 7SL se encuentren ampliamente distribuidos a lo largo de la escala filogenética, incluso en el organismo *T. brucei* (Michaeli S. y col. 1992), organismo evolutivamente cercano a *E. histolytica*.

d) El que posiblemente *E. histolytica* contenga un RNA homólogo al RNA 7SL del SRP (datos de nuestro laboratorio no publicados).

Dado los datos anteriores, de manera preliminar se puede suponer que es muy probable que *E. histolytica* posea un complejo funcional SRP o parecido a SRP que cumple la función de direccionar proteínas con secuencias peptídicas parecidas a las secuencias señal hacia alguna membrana. Esta membrana podría ser:

a) La membrana plasmática de la ameba como sucede en el caso de la bacteria *E. coli*.

b) La membrana de un retículo endoplasmático aun no identificado en *E. histolytica*, como en el caso del organismo *Giardia lamblia* donde se encontró por técnicas de inmunodetección un retículo rugoso que había escapado a la detección microscópica (Gillin F. D. y col. 1991).

c) O alternativamente podría ser una membrana novedosa para el caso de los tipos de translocación conocidos, como por ejemplo: hacia las membranas de las vesículas digestivas de la amiba.

Lo más probable (por otros datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio que sugieren la presencia de genes homólogos a otros genes involucrados en la secreción (genes *sec*), es que exista una maquinaria de secreción que involucre estructuras no identificadas aun que sean parecidas al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi. Estudios posteriores siguiendo la vía actual de estudio seguramente nos proporcionaran datos al respecto.

5.- Los siguientes estudios que se tienen programados son el análisis por "Southern" y por "Northern" de *E. histolytica*. Para lo cual se diseñaron dos oligonucleótidos (Figura. 11).

a) El primero denominado GMDif54 es homólogo a la región descrita anteriormente que va del nucleótido 142 al 162. Este oligo servirá para determinar si esta región existe en el genoma de la amiba y si es específico.

b) El segundo oligo denominado GMEsp54 es homólogo a la región que va del nucleótido 301 al 321. Este oligo se espera que sea específico para el gene SRP54 de la amiba determinado por la secuencia de la clona 41. Condiciones mas laxas de hibridación podrían determinar si existe una familia de estos genes en *E. histolytica*.

El oligo GMEsp54 (o alternativamente un producto de PCR T7-SP6 de la clona 41 marcado durante la reacción de PCR por incorporación de α - P^{32} CTP), se utilizará además para efectuar una búsqueda en el banco λ -ZAP de *E. histolytica* HK9, con el fin de clonar el gene completo de SRP54 de este organismo y continuar su análisis.

REFERENCIAS.

- Agrawal A., Pandey V. C., Kumar S. Sagar P. (1989). secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NIH-200 and properties of the extracellular enzyme. *J Protozool* Vol. 36, No. 1, 90-93.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson D.J. (1989). molecular biology of the cell, second edition. Garland Publishing Inc. New York and London.
- Aley S. B., Lohn Z. A., Scott W. A. (1984). endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* Vol. 152, 391.
- Andreazzoli M., Gerbi S. A. (1991). changes in 7SL RNA conformation during the signal recognition particle cycle. *EMBOJ* Vol. 10, 767- 777
- Bakker-Grunwald T., Wöstmann C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitology Today* Vol 9, No. 1, 27-31
- Bercovich J. A., Grinstein S., Zorzopulos J. (1992). effect of DNA concentration on recombinant plasmid recovery after blunt-end ligation. *Biotechniques* Vol. 12, No. 2. 190-193.
- Bernstein H. D., Poritz M. A., Strub K., Hoben P. J., Brenner S., Walter P. (1989). model for signal sequence recognition from aminoacid sequence of 54kDa subunit of signal recognition particle. *Nature* Vol. 340, 482-486.
- Bernstein H. D., Rapoport T. A. (1989). cytosolic protein translocation factors. Is SRP still unique. *Cell* Vol. 58, 1017- 1019
- Bernstein H. D., Zopf D., Freymann D. M., Walter P. (1993). functional substitution of the signal recognition particle 54kDa subunit by its escherichia-coli homolog. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Vol. 90, 5229-5233
- Birnboim H. C., Doly J. (1979). a rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research*. Vol. 7, No. 6, 1513- 1523.
- Bole D. G., Hendershot L. M., Kearney J. F. (1986). posttranslational association of immunoglobulin heavychain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting hybridomas. *J Cell Biol* Vol. 102, 1558-1566
- Brown T.A., (1991) Lab Fax. *Bios Scientific Publihers, Blackwell Scientific Publications.*
- Catrine A., Bjørn-Ivar H., Rein A., Kjell K. (1988) optimal conditions for hybridization with oligonucleotides: a study with *myc* -oncogene DNA probes. *Analytical Biochemistry* Vol. 170, 193-202.
- Cavalier-Smith T (1991). archamobae.. the ancestral eukarionte ? *Biosystems* Vol. 25, 25-38.
- Clark M. J. (1988). novel non-template nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic, and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acid Research*. Vol. 16, No. 20, 9677- 9685.

- Connolly T., Gilmore R. (1989). the signal recognition particle receptor mediates GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide *Cell*. Vol. 57 No. 5 99, 2253
- Connolly T., Rapiejko P. J., Gilmore R. (1991). requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* Vol. 252, 1171
- Char S., Farthing M. J. G. (1992). codon usage in *Entamoeba histolytica*. *Int Jour for Para.* Vol. 22, 381-383.
- David F. Barker. (1993). a more robust, rapid alkaline denaturation sequencing method. *Biotechniques* Vol. 14, No. 2. 168-169.
- Deshaies R. J., Sanders S. L., Feldheim D. A., Schekman R. (1991). assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum, into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* Vol. 349, 806
- Deshaies R. J., Schekman R. (1989). Sec62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol* Vol. 109, 2653-2664.
- Diamond L. S., (1968) techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. and *E. histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.* Vol. 54, 1047-1056.
- Dobell C. (1919). the amoeba living in man. A zoological monograph. Jhon Ball sons and Danielson, London.
- Evans E., Gilmore R., Blobel G. (1986). purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Vol. 83, 581
- Freedman R. B. (1984). purification of a protein complex with disulfide isomerase activity . *Trends in Biochem Sci* Vol. 9, 438-441
- Gillin F. D., Reiner D. S., McCaffery M. (1991). organelles of protein transport in *giardia lamblia*. *Parasitology Today* Vol. 7 No. 5
- Gilmore R., Walter P., Blobel G. (1982). protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* Vol. 95, No. 4 70.
- Görlich D., Hartmann E., Prehn S., Rapoport T. A. (1992). a protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357. 47-52.
- Görlich D., Prehn S., Hartmann E., Kalies K-U., Rapoport (1992). a mammalian homolog of Sec51p and Sec Yp is associated with ribosome and nascent polypeptides during translocation. *Cell* Vol. 71, 489-503.
- Görlich D., Rapoport T. A. (1993). protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* Vol. 75, 615-630.
- Guerrant R. L. (1986). amebiasis: introduction, current status and research questions. *Rev*

- Haas I. G., Wabl M. (1984). immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* Vol. 3 0 6, 387- 389
- Hann B. C., Stirling C. J., Walter P. (1992). Sec65 gene product is a subunit of the yeast signal recognition particle require for its integrity. *Nature* Vol. 3 5 6, 532- 533.
- Hartley J. L., Gregory T. J. (1981). cloning multiple copies of a DNA segment. *Gene* Vol. 1 3, 347.
- Hartmann E., Wiedmann M., Rapoport T. A. (1989). a membrane component of the endoplasmic reticulum that may be essential for protein translocation. *EMBOJ* Vol. 8, 2225
- Hertz J., Flint N., Stanley K., Frank R., Dobberstein B. (1990). the 68 kDa protein of signal recognition particle contains a glycine-rich region also found in certain RNA-binding proteins. *FEBS* Vol. 2 7 6, 103-107
- High S., Dobberstein E. (1991). the signal sequence interacts with the methionine rich domain of the 54kDa protein of the signal recognition particle. *J Cell Biol* Vol. 1 1 3, 229-233
- Innis M. A., Gelfant D. H., Sninsky J. J., White T. J. (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press Inc.*
- Ish-Horowicz D., Burke J. F. (1981). rapid efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Research*. Vol. 9, No. 1 3, 2989- 2995.
- Kaufman D. L., Evans G. A. (1990). restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques* Vol. 9, 305-306
- Kellaris K. V., Bowen S., Gilmore R. (1991). ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34kDa integral membrane protein. *J Cell Biol* Vol. 1 1 4, 21
- Kelleher D. J., Kreibich G., Gilmore R. (1992). oligosaccharidetransferase activity is associated with a protein complex composed of ribophorin I and II and a 48kDa subunit. *Cell* Vol. 6 9, 55
- Ken'ichiro Hayashi, Masako Nakazawa, Yukuo Ishizaki, Nobutsugu Hiraoka and Akira Obayashi (1986). regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol. *Nucleic Acid Research*. Vol. 14, No. 1 9, 7617-7631.
- Klappa P., Mayinger P., Pipkorn R., Zimmermann M., Zimmermann R. (1991). a microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *EMBOJ* Vol. 1 0, 2795
- Knoth K., Roberds S., Poteet C., Tamkun M., (1988) highly degenerate, inosine-containing primers specifically amplify rare cDNA using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research*. Vol. 16, No 2 2, 10932.
- Landry S. J., Gierasch L. M. (1991), recognition of nascent polypeptides for targeting and folding. *TIBS* Vol. 1 6, 159-153.

- Leader D. P. (1979). protein biosynthesis on membrane-bound ribosomes. *TIBS* Vol. 4 , 205
- Luaces A. L., Barret A. J. (1988). affinity purification and biochemical characterization of histolyn the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J.* Vol. 2 5 0, 903-909
- Lutcke W., High S., Romisch K., Ashford A. J., Dobberstein E. (1992). the methionine rich domain of the 54kDa subunit of the signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. *EMBO J* Vol.1 1, 1543- 1551
- Lutcke H., Prehn S., Ashford A. J., Remus M., Frank R., Dobberstein B. (1993). assembly of the 68- and 72- kDa proteins of signal recognition particle with 7S RNA. *J Cell Biol* Vol. 1 2 1, 5
- Martínez-Palomo A. (1982). Cell Biology. the biology of *Entamoeba histolytica*. . Research Studies Press. Chichister.
- McPherson M. J., Quirke P., Taylor G. R. (1992) PCR a practical approach. *The practical Approach series, IRL press.*
- Meyer D. I., Krause E., Dobberstein B. (1982). secretory protein translocation across membranes- the role of the "docking protein". *Nature* Vol. 2 9 7 No.5 0 3 .
- Meyerhans A., Vartain J-P., Wain-Hobson Simon. (1990). DNA recombination during PCR. *NAR* Vol. 1 8, 1687-1691
- Michael Zucker. (1989). on finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* Vol. 2 4 4, No. 7 48-52.
- Michaeli S., Podell D., Agabian N., Ullu E. (1992). the 7S RNA homolog of *Trypanosoma brucei* is closely related to mamalian 7S RNA. *Mol Biochem Parasitol* Vol. 5 1, 55-64
- Müller M. (1988). energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology* Vol. 4 2, 465-488.
- Munsh A., Wiedmann M., Rapoport T. A. (1992). yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic membrane. *Cell* Vol. 6 9, 343.
- Murray y Thomson. (1980). rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research.* Vol. 8 , 4321
- Patil R. V., Dekker E. E., (1990) PCR amplification of an escherichia coli gene using mixed primers containing deoxyinosine at ambiguous positions in degenerate amino acid codons. *Nucleic Acid Research.* Vol. 18, No. 1 0, 3080.
- Patricia V. King, Robert W. Blakesley (1986). optimizing DNA ligations for transformation. *FOCUS.* Vol. 8 , No. 1. 1-3.
- Phillips G. J., Silhavy T. J. (1992). the *E. coli* ffh gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature* Vol. 3 5 9, 744-776
- Pryer N. K., Wuestehube L. J., Schekman R. (1992). vesicle mediated protein sorting. *Annu*

- Randall K. Saiki, David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Karby B. Mullis, Henry A. Erlich (1988). primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* Vol. . 239, 29
- Rapiejko P. J., Gilmore R. (1992). protein translocation across the ER requires a functional GTP binding site in the alpha subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* Vol. 117 No 4
- Rapoport T. A. (1992). transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *SCIENCE* Vol 258. 931-936.
- Ravdin J. L., Schlesinger P. H., Murphy C. F., Gluzman I. A., Krogstad D. J. (1986). acid intracellular vesicles and the cytolysis of mamalian target cells by *Entamoeba histolytica*. *J protozool.* Vol. 33, 478.
- Reed S. L., Braude A. L. (1988) extraintestinal disease: clinical syndromes, diagnostic profile and therapy. In: amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica* . edited by Ravdin J. I. New York, John Wiley.
- Reeves R. E., Lushbaugh T. S., Montalvo F. E. (1971). characterization of deoxyribonucleic acid of *Entamoeba histolytica*. by cesium chloride d- Robinson A., Kaderbhai M. A., Austen B. M. (1987). *Biochem J* Vol. 242, No. 57, 939-944.
- Rosebaum R. M., Wittner M. (1970). ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica*. with particular reference to helical bodies. *J Cell Biol* Vol. 4 5, 367-382.
- Rosemberg I., Bach D., Loew L. M., Gitler C. (1989). isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amobeapore) produce by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitolo.* Vol. 3 3, 237-248.
- Roth R., Pierce S. (1987). in vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins. *Biochemistry* Vol. 26, 4179- 4182
- Rothblatt J. A., Deshaies R. J., Sanders S. L., Daum G., Schekman R. (1989). multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol* Vol. 109, 2641-2652.
- Römisch K., Webb J., Herz J., Prehn S., Frank R., Vingron M., Dobberstein B. (1989). homology of 54kDa protein of signal recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-Binding domains *Nature* Vol. 340, 478-482.
- Said Fernández S., Vargas Villarreal J., Castro Garza J., Mata Cardenas B., Navarro Montejo L., Garza Lozano G., and Martínez Rodríguez h. (1988) PEHPS medium: and alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. and *Entamoeba invadens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 82: 249-253.
- Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T., (1989). molecular cloning. a laboratory manual. 2nd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Sanders S. L., Whitfield K. M., Vogel J. P., Rose M. D. Schekman R. (1992). Sec61p and Bip directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* Vol. 69, 353.

- Savitz A. J., Meyer D. I. (1990). Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. *Nature* Vol. 3 4 6, 540
- Sawadogo M. and Van-Dyke M.W. (1991) a rapid method for the purification of deprotected oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acid Research*. Vol. 19 No. 3 , 674.
- Schatz J., Beckwith J. (1990) genetic analysis of protein export in *E. coli*. *Annu Rev Genet* Vol. 2 4, 215
- Selinger D., Brennwald P., Liao X., Wise J. A. (1993). identification of RNA sequences and structural elements required for assembly of fission yeast SRP54 protein with signal recognition particle RNA. *Mol and Cell Biolo* Vol. 1 3, 1353-1362
- Shelness G. S., Blobel G. (1990). two subunits of the canine signal peptidase complex are homologous to yeast Sec11 protein. *J Biol Chem* 2 6 5, 9512
- Shuldiner R. A., Tanner K., Scott L. A., Moore C., Roth Jesse (1991) ligase free subcloning: a versatile method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products in a single day. *Analytical Biochemistry* Vol. 1 9 4, 9-15.
- Siegel V., Walter P. (1988). functional dissection of the signal recognition particle. *TIBS* Vol. 1 3, 314-316.
- Simon M. S., Blobel G. (1992). signal peptides open protein- conducting channels in *E. coli*. *Cell*. Vol. 6 5. 371-380.
- Stirling C. J., Hewitt E. W. (1992). the *S. cerevisiae* Sec65 gene encodes a component of yeast signal recognition particle with homology to human sec19. *nature* Vol. 3 5 6, 534- 537
- Strub K., Walter P. (1990). assembly of the Alu domain of the signal recognition particle (SRP): dimerization of the two protein components is required for efficient binding to SRP RNA. *Mol Cell Biol* Vol. 1 0, 777-784
- Strub K., Moss J., Walter P. (1991). binding sites of the 9- and 14- kilodalton heterodimeric protein subunit of the signal recognition particle (SRP) are contained exclusively in the Alu domain of SRP RNA and contain a sequence that is conserved in evolution. *Mol Cell Biol* Vol. 1 1, 3949-3959
- Surgino A., Goodman H. M., Heyneker H. L., Shine J., Boyer H. W. y Cozzarelli N.Z. (1977). interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligase in joining of duplex DNA at base paired ends. *J. Biol. Chem.*, Vol. 2 5 2, 3987.
- Tannich E. (1991). homologous cysteine proteinases of pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. differences in structure and expression *J. Biol Chem* Vol. 2 6 6, 4798-4803.
- Tannich and Horstman (1992). percentage of codon usage in *Entamoeba histolytica*. *J. Molecular Evolution* Vol. 3 2, 274-273.
- Tajima S., Lauffer L., Rath V. L., Walter P. (1986). the signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* Vol. 1 0 3. 1167-1178.

ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
OFFICE OF THE GOVERNMENT DEVELOPMENT
COMMISSION

- Tazawa S., (1991). identification of a membrane protein responsible for ribosome binding in rough microsomal membranes. *J Biochem -tokio* Vol. 1 0 9, 89
- Thrift R. N., Andrews D. W., Walter P., Johnson A. E. (1991). a nascent membrane protein is located adjacent to ER membrane proteins throughout its integration and translation. *J Cell Biol* Vol. 1 1 3, 809
- Toyn J., Hibbs A. R., Sanz P., Crowe J., Meyer D. I. (1988). in vivo and in vitro analysis of pt11, a yeast ts mutant with a membrane associated defect in protein translocation. *EMBO J.* Vol. 7, 4347-4353.
- Wada I. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* Vol. 2 6 6, 19599
- Walsh J. A. (1986). problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* Vol. 8. 228-238.
- Walter P., Blobel G. (1981), translocation of all proteins across the endoplasmic reticulum: III. signal recognition protein causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* Vol. 9 1. 557-561.
- Walter P., Lingappa V. R. (1986). mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* Vol. 2, 499
- Wiedmann M., Kurzychaila T. V., Hartmann E., Rapoport T. A. (1987). a signal recognition receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature* Vol. 3 2 8, 830-833
- YaDeau J. T., Blobel G. (1989). solubilization and characterization of yeast signal peptidase. *J Biol Chem* Vol. 2 6 4, 2928
- Zheng-gang L., Schwartz M. L. (1992). an efficient method for blunt-End ligation of PCR products. *Biotechniques* Vol. 12, No. 1. 28-30.
- Zimmermann D. L., Walter P. (1991). an ATPbinding membrane protein is required for protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Cell Regul* Vol. 2, 851
- Zopf D., Bernstein H. D., Johnson A. E., Walter P. (1990). the methionine-rich domain of the 54kDa protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBOJ* Vol. 9, 4511-4517
- Zopf D., Bernstein H. D., Walter P. (1993). GTPase domain of the 54kDa subunit of the mammalian signal recognition particle is required for protein translocation but not for signal sequence binding. *J Cell Biol* Vol. 1 2 0, 1113- 1121
- Zwieb C. (1991). a basic region neighboring the lysine-rich C-terminus of protein SRP19 is required for binding to signal recognition particle RNA. *Biochem Cell Biol* Vol. 6 9, 649- 654
- Zwieb C. (1992). recognition of the tetranucleotide loop of signal recognition particle RNA by protein SRP19. *J Biol Chem* Vol. 2 6 7, 15650-15656