

00551

20



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

289029

"CARACTERIZACION Y EXPRESION DEL GENE
RAB8 DE *Entamoeba histolytica*"

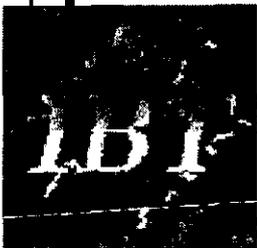
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A

PATRICIA JUAREZ CAMACHO

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L' followed by a long horizontal stroke.



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CUERNAVACA, MOR. ENERO DEL

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo fue realizado en el departamento
de Reconocimiento Molecular
y Bioestructura del Instituto de Biotecnología, UNAM
bajo la dirección
de la Dra. Rosana Sánchez López.**

Dedico esta tesis con todo mi cariño a las personas más importantes en mi vida:

Mi mamá Guadalupe Camacho Perdomo.

Mi hermanito José de Jesús Flores Camacho.

Mi esposo Pedro A. Morales Martínez.

Este logro es un paso más en mi formación y es nuestro, porque sin ustedes yo no sería lo que soy ni estaría aquí.
Los quiero mucho.

Paty

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente:

- Al Dr. Alejandro Alagón por ser además de un tutor un amigo. Por enseñarme a disfrutar de la ciencia y animarme a luchar por mis sueños.
- A la Dra. Rosana Sánchez López por dirigir este trabajo y por sus comentarios críticos.
- A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Mario E. Zurita, Dr. Jorge L. Folch y la estudiante de doctorado Victoria Pando Robles.
- A los miembros del Jurado del examen de grado: Dr. Federico Sánchez, Dr. Fernando Esquivel, Dra. Yvonne Rosenstein, Dra. Rosario Vera y Dra. Rosana Sánchez.
- El apoyo técnico brindado por Felipe Olvera, Alejandro Olvera, Olegaria Benítez y Martina Romero.
- El apoyo administrativo de Angélica Linares.
- Al Dr. Alejandro Alagón por su apoyo en la obtención de los anticuerpos utilizados en este trabajo y al Dr. Roberto Stock por su apoyo en el procesamiento de imágenes de microscopía confocal.
- A mis compañeros de laboratorio especialmente a Marco A. Ramos y a Angeles Gutierrez.
- A mis amigos: Naty, Lidia, Gaby, Gloria, Humberto y Paul.
- Por último a Conacyt que me otorgó una beca para realizar mis estudios de maestría.

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCION

1.1	Generalidades de la vía secretoria.	1
1.2	Tráfico vesicular de proteínas en células eucariotes.	2
1.3	Proteínas de la superfamilia de GTPasas ("GTP binding proteins").	4
1.4	Proteínas Rab.	5
1.4.1	Características generales.	6
1.4.1.1	Localización de las proteínas Rab.	6
1.4.1.2	Ciclo de las proteínas Rab.	8
1.4.1.3	Dominios conservados.	11
1.4.1.4	Prenilación.	11
1.4.1.5	Interacciones Rab-SNARE y el tráfico vesicular.	12
1.5	Sec4p/Rab8.	15
1.6	<i>Entamoeba histolytica</i> como modelo de estudio.	16
1.6.1	La amibiasis.	16
1.6.2	Distribución global de la amibiasis.	16
1.7	Características de <i>Entamoeba histolytica</i> .	17
1.7.1	La célula.	17
1.7.2	El genoma amibiano.	20
1.7.3	Patogenicidad y mecanismo de invasión.	21
1.8	Justificación del proyecto.	21

II. OBJETIVOS 23

III. MATERIALES Y METODOS

3.1	Buffers y Soluciones.	24
3.1.1	Para extracción y análisis de DNA.	24
3.1.2	Para extracción y análisis de RNA.	24
3.1.3	Para geles de proteínas.	24
3.2	Cepas utilizadas.	25
3.3	Medios de Cultivo	25
3.4	Plásmidos utilizados..	26

3.5	Marcadores de peso molecular.	26
3.6	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.	26
3.7	Software utilizado.	27
3.8	Cultivos celulares.	27
3.9	Obtención de la secuencia completa del gene <i>Ehrab8</i> .	27
3.9.1	Tamizado.	27
3.9.2	Escisión del fagémido.	28
3.9.3	Clonación, Transformación y Secuenciación.	29
3.9.4	3' RACE.	39
3.9.5	5' RACE.	30
3.10	Extracción de DNA total amibiano por gradiente de Sacarosa.	30
3.11	Ensayo fluométrico para cuantificar DNA con YOPRO-1.	32
3.12	Marcaje radioactivo de sonda.	32
3.13	"Southern blot".	32
3.14	Extracción RNA total amibiano.	33
3.15	Preparación de RNA Poli A +	33
3.16	"Northern blot".	34
3.17	Expresión de la proteína recombinante His- <i>EhRab8</i> .	34
3.17.1	Clonación del gene <i>Ehrab8</i> en un vector de expresión.	35
3.17.2	Expresión de His- <i>EhRab8</i> en <i>E.coli</i> cepa XLI Blue.	35
3.17.3	Purificación de His- <i>EhRab8</i> .	35
3.18	Expresión de la proteína HGFPCOOHRab8.	36
3.19	Electroforesis geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	36
3.20	Producción de anticuerpos policlonales.	36
3.20.1	Preparación del inmunógeno.	36
3.20.2	Producción de anticuerpos policlonales	37
3.20.3	Procesamiento de sueros	37
3.21	Determinación del título de anticuerpos.	37
3.22	Purificación y caracterización de los anticuerpos policlonales.	38
3.22.1	Acoplamiento de HGFPCOOHRab8 a sefarosa 4B-CNBr.	38
3.22.2	Acoplamiento del péptido Rab8 177-194 a Sefarosa 6B-Tiopropilo.	38
3.22.3	Purificación de anticuerpos.	38
3.23	Preparación de muestras y lisado amibiano.	39
3.24	"Western blot".	39
3.25	Fijar células con P-formaldehido 4%.	40

IV RESULTADOS

4.1	Obtención de la secuencia completa del gene <i>Ehrab8</i> .	41
4.1.1	Tamizado de un banco genómico de <i>E. histolytica</i> .	41
4.1.2	Análisis del patrón de restricción de las clonas que amplifican el fragmento de 203 pb.	41
4.1.3	Análisis por Southern blot de las clonas.	42
4.1.4	Secuenciación de la clona 8.1.15.	44
4.2	Identificación del inicio de la transcripción.	51
4.3	Secuencia polipeptídica de <i>EhRab8</i> deducida y homología.	53
4.4	“Southern blot”.	55
4.5	“Northern blot”.	56
4.6	Expresión de la proteína recombinante His- <i>EhRab8</i> .	56
4.7	Determinación de la solubilidad de la proteína.	58
4.8	Purificación de la proteína His- <i>EhRab8</i> .	58
4.9	Obtención de anticuerpos antiHis- <i>EhRab8</i> .	60
4.10	Western blot con suero total.	60
4.11	Purificación de los anticuerpos.	61
4.11.1	Construcción de la proteína recombinante His-GFPCOOHRab8.	61
4.11.2	Acoplamiento de la proteína recombinante a sefarosa 4B-CNBr y purificación de los anticuerpos anti-COOHRab8.	61
4.11.3	Caracterización de los anticuerpos anti-COOHRab8.	63
4.12	Citocalización.	70
V DISCUSION		72
VI CONCLUSIONES		78
VII PERSPECTIVAS		79
VIII BIBLIOGRAFIA		80

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

1. Tráfico vesicular en eucariotes.	3
2. Ciclo de las proteínas Rab.	9
3. Estructura de la proteína ras.	10
4. Eventos de “Docking” en el transporte vesicular.	14
5. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .	18
6. Liberación del inserto de las clonas positivas.	43
7. Southern blot de las clonas positivas.	43
8. Estrategia de secuenciación del gene <i>Ehrab8</i> .	45
9. Organización del gene <i>Ehrab8</i> dentro de la clona 8.1.15.	46
10. Liberación del inserto de las clonas 3' RACE.	48
11. Secuencia completa del gene <i>Ehrab8</i> .	49
12. Uso de codones del gene <i>Ehrab8</i> .	50
13. Alineamiento del 5' RACE de <i>Ehrab8</i> .	52
14. Alineamiento entre proteínas tipo Rab8 de diferentes organismos.	54
15. “Northern blot” y “Southern blot” de <i>Ehrab8</i> .	57
16. Construcción pQE30- <i>EhRab8</i> .	59
17. Análisis de la proteína His- <i>EhRab8</i> .	59
18. Western blot con suero total.	62
19. Esquema de la estructura primaria de la proteína recombinante HGFP ^{COOH} Rab8.	62
20. Western blot con anti- ^{COOH} Rab8.	65
21. Western blot de un gel no reductor.	65
22. Competencia de proteínas de <i>E.coli</i> .	67
23. Reconocimiento de la fracción pegada anti-péptido.	67
24. Western blot de los anticuerpos anti- <i>EhRab8</i> .	68
25. Estrategia para la purificación de anticuerpos específicos contra <i>EhRab8</i> .	69
26. Localización de <i>EhRab8</i> en amiba.	71

Tablas

Tabla 1. Miembros de la superfamilia ras en mamíferos.	5
Tabla 2. Localización y función de las proteínas Rab en levadura y mamífero.	7
Tabla 3. Composición nucleotídica de <i>Ehrab8</i> .	47
Tabla 4. Porcentaje de identidad y similitud de proteínas tipo Rab8.	53
Tabla 5. Comparación de motivos de unión a GTP y de motivos RabF encontrados en <i>EhRab8</i> .	55
Tabla 6. Títulos de los anticuerpos anti-His <i>EhRab8</i> .	60

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AT	Temperatura ambiente
Amp	Ampicilina
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate
BSA	Albúmina sérica bovina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHFR	Dihidrofolato reductasa.
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
Ehrab8	Rab8 de <i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	“Enzyme Linked Inmunosorben Assay”
EST	“Expressed sequence tag”
E64	N-[N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina
g	gramos
gDNA	DNA genómico
GAP	“GTPase-activating protein”
GDF	“GDI-displacement factor”
GDI	“GDP-dissociation inhibitor”
GEF	“guanine nucleotide exchange factor”
GTP	Guanosine triphosphate
h	horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
Kb	kilo bases
kDa	Kilodalton
M	Molar
mM	Milimolar
min	Minutos
ml	Mililitros
mRNA	RNA mensajero
μ l	Microlitros
NBT	Nitroblue tetrazolium salt
Nm	Nanómetros
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de DNA polimerasa

PI	Ioduro de propidio
p.e.	Por ejemplo
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA
RE	Retículo Endoplásmico
REP	“Rab escort protein”
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecilsulfato de sodio.
SNAP	“soluble NSF-attachment protein”
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor”
Sol.	solución
ssDNA	DNA de esperma de salmón.
v-SNARE	“vesicle SNARE”
t-SNARE	“target SNARE”
TGN	<i>trans</i> -Golgi Network
tH₂O	agua tetradestilada
Tris	Trihidroximetil aminometano
Tris-HCl	Tris-ácido clorhídrico
Tween 20	Polyoxietileno (20) sorbitol monolaurante
ufp	Unidades formadoras de placa

RESUMEN

Las proteínas Rab son GTPasas de bajo peso molecular pertenecientes a la familia de las proteínas Rab, su función consiste en regular el tráfico vesicular a lo largo de la vía biosintética y endocítica en células eucariotas. La proteína Rab8 de mamífero y su contraparte en levadura Sec4 han sido implicadas como reguladores del tráfico vesicular del TGN hacia la membrana plasmática.

Hemos caracterizado un homólogo de Sec4/Rab8 en el parásito causante de la amibiasis *Entamoeba histolytica*. *Ehrab8* tiene un marco abierto de lectura de 600 pb y predice un polipéptido con un peso molecular teórico de 22,272 Daltons. Alineamientos de *EhRab8* con otras proteínas Rabs han demostrado que *EhRab8* muestra un alto porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos con proteínas tipo Rab8 de otros eucariotes: 61% con SAS1 de *Dictyostelium discoideum*, 62% con YPT2 de *Saccharomyces pombe*, 58% con Rab8 de humano and 47% con Sec4 de *Saccharomyces cerevisiae*. El uso de codones del gene *Ehrab8* es característico de *E. histolytica*. Los dominios funcionales previamente definidos para las Rab GTPasas estuvieron presentes en la secuencia amibiana, tales como los dominios de unión a GTP, el dominio efector y el motivo C-C carboxilo terminal. La proteína recombinante His-*EhRab8* fué expresada en *E.coli* y utilizada para la producción de anticuerpos anti-*EhRab8*, los anticuerpos fueron purificados y utilizados en la citolocalización de *EhRab8* en amiba, los resultados indican que la proteína se encuentra localizada en estructuras vesiculares y en la membrana plasmática.

I. INTRODUCCION

1.1 Generalidades de la vía secretoria.

En células procariotas y eucariotas, los procesos especializados tales como secreción y transducción de señales, así como las reacciones enzimáticas del metabolismo intermediario, son organizados dentro de membranas y compartimentos membranosos en el interior de la células, respectivamente. Las características bioquímicas de cada compartimento y la especificidad y direccionalidad de los procesos secretorios puede ser mantenidas sólo si existen los mecanismos necesarios para el "targeting" selectivo de las proteínas a su localización subcelular correcta, para su transporte activo a través de membranas y para sus modificaciones covalentes y conformacionales.

Las proteínas nacientes contienen señales que determinan su destino final. En *Escherichia coli*, las proteínas recién sintetizadas pueden permanecer en el citosol, ser insertadas o transportadas a través de la membrana interna, permanecer en el espacio periplásmico o bien, se insertan en la membrana plasmática [Rothblatt *et al*, 1994]. En contraste, la vía secretoria en eucariotes comprende una serie de compartimentos a través de los cuales un gran número de proteínas se dirigen hacia el espacio extracelular [Palade, 1975]. Las proteínas que van a ser secretadas, así como las proteínas destinadas al retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, lisosomas y membrana plasmática contienen una secuencia señal hidrofóbica en el amino terminal que es reconocida por un multímero ribonucleoproteico llamado Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP, del inglés Signal Recognition Particle). Al emerger del ribosoma, la secuencia señal es reconocida por el complejo SRP, se detiene la traducción y el complejo ribosoma-SRP-péptido naciente es dirigido hacia la membrana del RE. La interacción del SRP con su receptor, presente en la membrana del RE, marca la pauta para que reinicie la traducción, el SRP se separa del complejo y el péptido naciente es cotranslocado al RE. Posterior a la translocación, las proteínas son modificadas en el lumen de este compartimento: la secuencia señal amino terminal es cortada por una peptidasa señal que reconoce al péptido señal, se forman los puentes disulfuro y muchas proteínas son glicosiladas [Kornfeld and Kornfeld, 1985]. Con excepción de aquellas proteínas retenidas selectivamente por ser residentes del RE [Pelham, 1989], las proteínas son transportadas al complejo de Golgi mediante

Golgi mediante vesículas de transporte. En el Golgi, las proteínas sufren modificaciones (p.e. glicosilación terminal) y son dirigidas hacia su destino final: lisosomas, membrana plasmática o medio extracelular [Pryer *et al*, 1992; Rothman and Orci, 1992].

1.2 Tráfico vesicular de proteínas en células eucariotes.

Las células eucariotes están organizadas en múltiples compartimentos, cada uno con su propio conjunto de proteínas celulares. El establecimiento de esta compleja red de organelos, muchos de los cuales intercambian componentes químicos, depende del transporte apropiado de proteínas. En eucariotes, tanto unicelulares como pluricelulares, el tráfico entre organelos dentro de la vía secretoria ocurre cuando vesículas derivadas de membranas de un compartimento donador se fusionan con membranas de un compartimento aceptor específico. Estas vesículas funcionan como unidades acarreadoras que transfieren direccionalmente moléculas cargo (proteínas, lípidos) entre distintos compartimentos subcelulares [González and Scheller, 1999]. La Figura 1 muestra un esquema del tráfico vesicular entre compartimentos. Este proceso es regulado por componentes proteicos localizados en la membrana donadora, en la vesícula de transporte y la membrana blanco, así como factores solubles localizados en el citoplasma. Entre los componentes proteicos localizados en la membrana tenemos a la familia de proteínas SNARE que están presentes en la membrana de las vesículas de transporte (v-SNARE) y la membrana del organelo blanco o "target" (t-SNARE). Las proteínas SNARE sirven como receptores de factores solubles necesarios para el "docking" y la fusión de la vesícula a la membrana blanco. Entre los componentes solubles localizados en el citoplasma, los mejor caracterizados son la familia de proteínas Rab/YPT de la superfamilia de pequeñas GTPasas (también denominadas "small GTP-binding proteins" o proteínas que unen GTP pequeñas). Estas proteínas han sido implicadas como reguladores del "docking" vesicular y del apareamiento entre proteínas v-SNARE y t-SNARE .

Los componentes proteicos requeridos para el transporte vesicular de proteínas han sido bien conservados durante la evolución; por ejemplo, el transporte entre membranas en levaduras y en las células de mamífero obedece principalmente las mismas reglas y ambos usan el mismo mecanismo molecular.

Tráfico Vesicular en Eucariotes

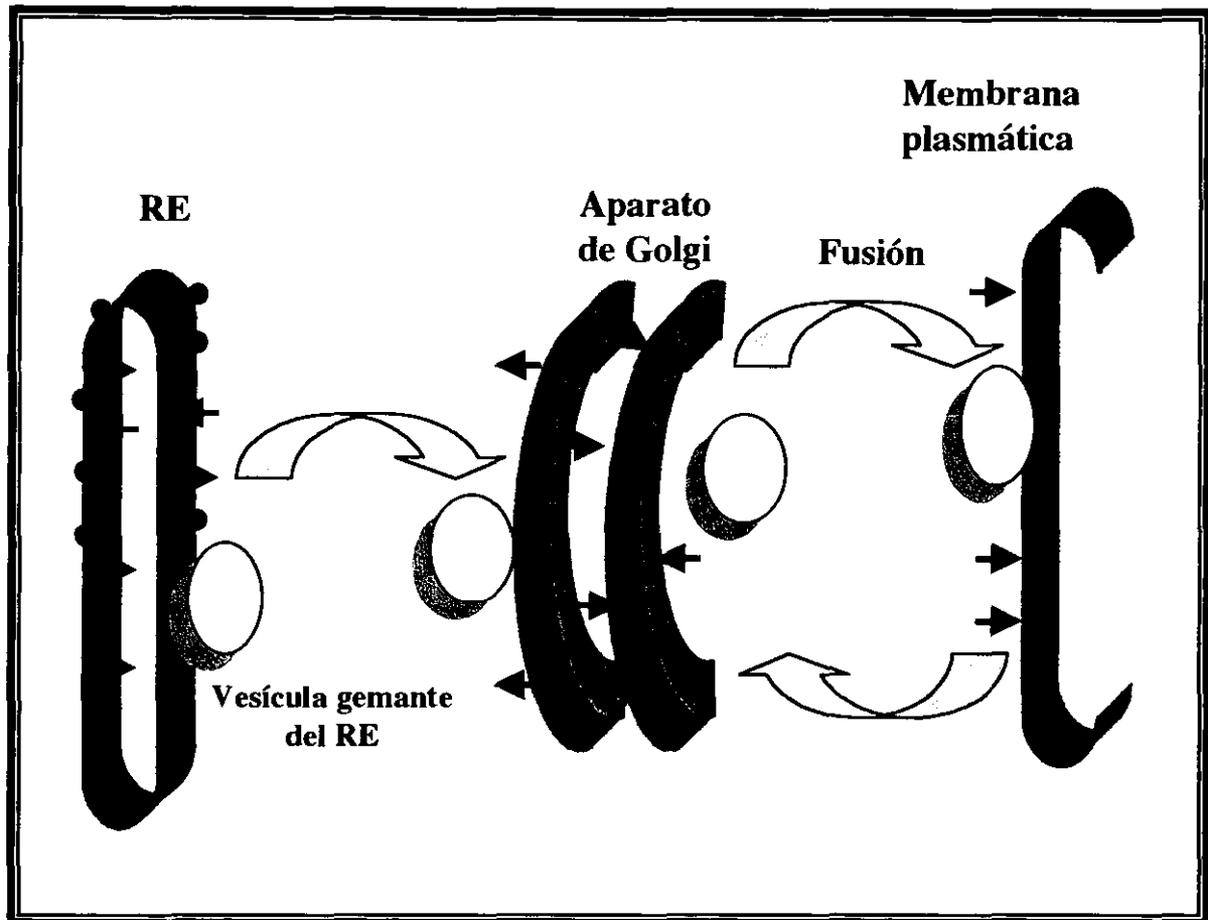


Figura 1. La imagen representa el tráfico vesicular entre membranas internas: RE, aparato de Golgi y membrana plasmática.

Algunos componentes son específicos de una etapa de transporte en particular, otros son comunes a lo largo de las vías secretora y endocítica. [Lazar, 1997].

1.3 Proteínas de la superfamilia de GTPasas.

Las proteínas que unen GTP son miembros de una gran familia de proteínas presentes en todas las células eucariotas, donde realizan diversas funciones de regulación. Dependiendo de su composición de subunidades y de su tamaño, se clasifican como proteínas triméricas que unen GTP (también conocidas como proteínas G clásicas), las cuales consisten en una subunidad α que une al nucleótido guanina, una subunidad β y una subunidad γ , y como proteínas monoméricas de bajo peso molecular (aprox. 20-25 kDa), también conocidas como "small GTP-binding proteins" o proteínas que unen GTP similares a ras [Ferro-Novick and Novick, 1993]. La primera GTPasa de bajo peso molecular descubierta fue la proteína ras, de ahí su identificación como proteínas similares a ras.

En base al análisis de homología de sus secuencias, las GTPasas pequeñas se clasifican en 5 subfamilias: Ras, Rho, Rab, ARF y Ran [Hall, 1990; Boguski and McCormick, 1993]. La subfamilia de las proteínas Ras está involucrada en la regulación del ciclo celular, mientras que la subfamilia de las proteínas Rho participa en la organización del citoesqueleto de actina. Las proteínas tipo Ran juegan un papel central en el tráfico de proteínas dentro y fuera del núcleo. Las subfamilias de las proteínas Rab y ARF están involucradas en el control de diferentes aspectos del transporte vesicular (ver Tabla 1).

Las GTPasas pequeñas son hidrofílicas, no contienen dominios transmembranales, por lo tanto, no son proteínas integrales de membrana pero se pueden encontrar asociadas a la membrana. Para unirse a la membrana de las vesículas requieren de un grupo lipídico, el cual adquieren por una modificación post-traducciona llamada prenilación. A excepción de las proteínas Ran, todas las demás GTPasas pequeñas muestran uno o más grupos lipídicos unidos covalentemente.

Subfamilia	Miembros	Funciones Biológicas
Ras	H-ras/Ki-ras/N-ras; R-ras; rap1A/b; rap2A/B; RalA/B; TC21	Crecimiento Diferenciación
Rho	RhoA/RhoB/RhoC; Rac 1/2; CDC42/G25K; RhoG; TC10	Actividad de Integrina Citoesqueleto de actina NADPH oxidasa
Rab	Rab1 Rab26	Transporte vesicular
ARF	ARF1ARF6	Transporte vesicular Estimulación de PLD (Phospholipase D)
Ran	Ran1	Importe de proteínas nucleares

Tabla 1. Miembros de la superfamilia Ras en mamíferos.
(Tomada de Hall, A., Annu. Rev. Cell Bol, 1994, 10:31-54.)

1.4 Proteínas Rab

La familia de las proteínas Rab/YPT constituyen la subfamilia más grande de la superfamilia de las proteínas ras. En levaduras, en general, se llaman YPT, mientras que en mamíferos y otros organismos se conocen como proteínas Rab. Las primeras proteínas Rab/YPT identificadas, fueron las proteínas Sec4p y YPT1p, encontradas en levadura [Salminen and Novick, 1987; Gallwitz *et al*, 1983]; a la fecha se conocen 11 proteínas más en *S. cerevisiae*: YPT31p o YPT8p, YPT32p, YPT51p o YPT21p, YPT52p, YPT53p, YPT6p, YPT7p, YPT10p y YPT11p. En células de mamífero el número es más grande, siendo más de 40 proteínas Rab identificadas, incluyendo isoformas y proteínas homólogas a las proteínas YPT mencionadas (ver Tabla 2). El número de proteínas Rab encontradas en mamífero correlaciona con la diversidad de las rutas de transporte vesicular que se presentan en la variedad de tipos celulares a diferencia de las levaduras.

1.4.1 Características generales.

1.4.1.1 Localización de las proteínas Rab.

La mayoría de las proteínas Rab identificadas son ubicuas aunque su nivel de expresión puede variar de un tipo celular a otro; sin embargo, algunas de ellas son tipo-celular o tejido específicas. Muchas de las proteínas Rab han sido localizadas usando anticuerpos específicos en una combinación de experimentos de fraccionamiento subcelular, inmunofluorescencia, microscopía confocal y microscopía electrónica. La Tabla 2 resume lo que se conoce acerca de la localización intracelular de las proteínas Rab en mamífero y de las proteínas YPT en levadura. Todos los organelos (excepto los lisosomas) involucrados en las vías secretora y endocítica tienen por lo menos una proteína Rab asociada a su cara citoplásmica. En la mayoría de los casos, las proteínas Rab están asociadas a dos compartimentos adyacentes (p.e. *trans*-Golgi y membrana plasmática). Algunas de ellas han sido encontradas asociadas a la cara citoplásmica de las vesículas de transporte y también en forma soluble en el citosol. En conjunto estos datos, soportan la hipótesis de que las proteínas Rab están involucradas en la unión y fusión específica de vesículas de transporte a su compartimento aceptor [Martinez and Goud, 1998].

Proteína	Localización	Función	Referencias
Sec4	Vesículas post-Golgi, membrana plasmática	Transporte del Golgi a la membrana plasmática.	Goud <i>et al</i> , 1988; Salminen and Novick, 1987; Walworth <i>et al</i> , 1989.
YPT1 (Rab1A y Rab1B)	RE, <i>cis</i> -Golgi	Transporte del RE al Golgi, e intra-Golgi.	Jedd <i>et al</i> , 1995; Segev <i>et al</i> , 1988; Baker <i>et al</i> , 1990.
YPT31, YPT32	Golgi?	Transporte intra-Golgi, y del Golgi a la vacuola.	Benli <i>et al</i> , 1996.
YPT51, YPT52, YPT53	Endosomas	Transporte en la vía endocítica temprana.	Singer-Kruger <i>et al</i> , 1994.
YPT6 (Rab6)	?	Transporte intra-Golgi, y del Golgi a la vacuola.	Li and Warner, 1996; Tsukada and Gallwitz, 1996.
YPT7 (Rab7)	?	Transporte en la vía endocítica tardía, fusión homotípica de vacuolas.	Wichmann <i>et al</i> , 1992; Schimmoller and Riezman, 1993; Mayer and Wickner, 1997.
Rab1A, Rab1B	Compartimento intermedio <i>cis</i> -Golgi	Transporte del RE al Golgi e intra-Golgi	Saraste <i>et al</i> , 1995; Tisdale <i>et al</i> , 1992; Nuoffer <i>et al</i> , 1994; Plutner <i>et al</i> , 1992; Pind <i>et al</i> , 1994; Wilson <i>et al</i> , 1994.

Rab2	Compartimento intermedio <i>cis</i> -Golgi	Transporte del RE al Golgi	Tisdale <i>et al</i> , 1992; Chavrier <i>et al</i> , 1990
Rab3A	Vesículas sinápticas, granulos secretores	Exocitosis regulada en neuronas y células neuro-endócrinas	Darchen <i>et al</i> , 1990; Fischer von Mollard <i>et al</i> , 1990; Holz <i>et al</i> , 1994; Johannes <i>et al</i> , 1994.
Rab3B	Vesículas sinápticas? Uniones de células epiteliales polarizadas	Regulan la exocitosis en neuronas? ?	Liedo <i>et al</i> , 1993; Weber <i>et al</i> , 1994.
Rab3C	Vesículas sinápticas	Similar a Rab3A?	Fischer von Mollard <i>et al</i> , 1994.
Rab4A, Rab4B	Endosomas tempranos	Reciclaje de endosomas tempranos a la membrana plasmática.	Van der Sluijs <i>et al</i> , 1992.
Rab5A, Rab5B, Rab5C	Membrana plasmática, vesículas cubiertas de Clatrina, endosomas tempranos	Transporte de la membrana plasmática a endosomas tempranos, fusión de endosomas tempranos.	Chavrier <i>et al</i> , 1990; Gorvel <i>et al</i> , 1991 Bucci <i>et al</i> , 1992; Li and Stahl, 1993; Stenmark <i>et al</i> , 1994; Horiuchi <i>et al</i> , 1995.
Rab6	Medial/ <i>trans</i> -Golgi TGN	Transporte retrógrado intra-Golgi?	Goud <i>et al</i> , 1990; Antony <i>et al</i> , 1992; Deretic and Papermaster, 1993; Jasmin <i>et al</i> , 1992; Tixier-Vidal <i>et al</i> , 1993; Martinez <i>et al</i> , 1997.
Rab7	Endosomas tardíos	Transporte de endomas tempranos a tardíos y de endosomas tardíos a lisosoma.	Chavier <i>et al</i> , 1990; Papini <i>et al</i> , 1997.
Rab8	Vesículas basolaterales post-Golgi, uniones en células polarizadas	Transporte en células del TGN a la Membrana plasmática basolateral	Huber <i>et al</i> , 1993; Peranen <i>et al</i> , 1996.
Rab9	Endosomas tardíos, TGN	Transporte del endosoma tardío al TGN	Lombardi <i>et al</i> , 1993; Riederer <i>et al</i> , 1994.
Rab10	Vesículas Golgi y post-Golgi	?	Chen <i>et al</i> , 1993.
Rab11	TGN, endosomas reciclados, vesículas post-Golgi	Transporte a través de endosomas reciclados, endosomas al TGN?	Urbe <i>et al</i> , 1993; Ulrich <i>et al</i> , 1996:
Rab12	Complejo de Golgi?	?	Olkkonen <i>et al</i> , 1993.
Rab13	Uniones en células epiteliales polarizadas	?	Zahraoui <i>et al</i> , 1994.
Rab17	Membrana plasmática basolateral en células epiteliales, endosomas apicales	Transcitosis?	Lutcke <i>et al</i> , 1993.
Rab24	RE, <i>cis</i> -Golgi, endosomas tardíos	?	Olkkonen <i>et al</i> , 1993.
Rab27	Células retinales	?	Seabra <i>et al</i> , 1995.

Tabla 2. Localización y función de las proteínas Rab en levadura y en mamífero. [Tomada de Martínez O. y Goud B. *Biochimica et Biophysica Acta* 1404 (1998) 101-112].

1.4.1.2 Ciclo de las proteínas Rab.

Como otras GTPasas, las proteínas Rab ciclan entre una forma inactiva (unidas a GDP) y una forma activa (unidas a GTP). La reacción de intercambio de GDP por GTP es catalizada por proteínas conocidas como GEF (factor intercambiador de GDP) y se lleva a cabo cuando la proteína Rab está asociada a membrana. La actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rab es muy baja, por lo requiere de una proteína activadora GAP (proteína activadora de la actividad GTPasa) para estimular la hidrólisis del GTP [Martinez and Goud, 1998].

El ciclo funcional propuesto para las proteínas Rab se ilustra en la Figura 2. De manera simplificada, el modelo postula que la proteína Rab se asocia con la vesícula de transporte naciente del compartimento donador, se desplaza hacia el compartimento aceptor en donde toman lugar el "docking" y la fusión, y finalmente es reciclada hacia la membrana donadora por medio de intermediarios citosólicos.

En el citosol, las proteínas Rab son mantenidas en su conformación inactiva (unidas a GDP) por su asociación con GDI (inhibidor de la disociación de GDP). Después de que las proteínas Rab han sido post-traduccionalmente preniladas, se unen a la proteína GDI formando un complejo Rab-GDP/GDI. La proteína GDI impide la disociación del GDP y actúa como chaperona acompañando a la proteína Rab hacia su compartimento donador. En el compartimento donador GDI es liberada del complejo Rab-GDP/GDI por la interacción con la proteína GDF (factor de desplazamiento de GDI). El siguiente paso es la activación de la proteína Rab por el intercambio del GDP por GTP, catalizado por la proteína GEF (factor intercambiador de GDP). La activación de la proteína Rab es necesaria para su asociación con proteínas efectoras, tales como Rabphilina, Rabaptina-5 y serin-treonin kinasas que aseguran la fusión de la vesícula con su membrana blanco correcta. En su forma activa, la proteína Rab-GTP transporta a la vesícula proveniente del compartimento donador hacia su compartimento aceptor. Una vez establecido el contacto entre la vesícula y la membrana aceptor ("docking"), la proteína Rab-GTP interactúa con GAP, lo que activa la capacidad hidrolítica (GTPasa intrínseca) de la proteína Rab, convirtiendo el GTP en GDP. El ciclo de las proteínas Rab se cierra cuando GDI remueve a la proteína Rab-GDP de la

Ciclo de las proteínas Rabs

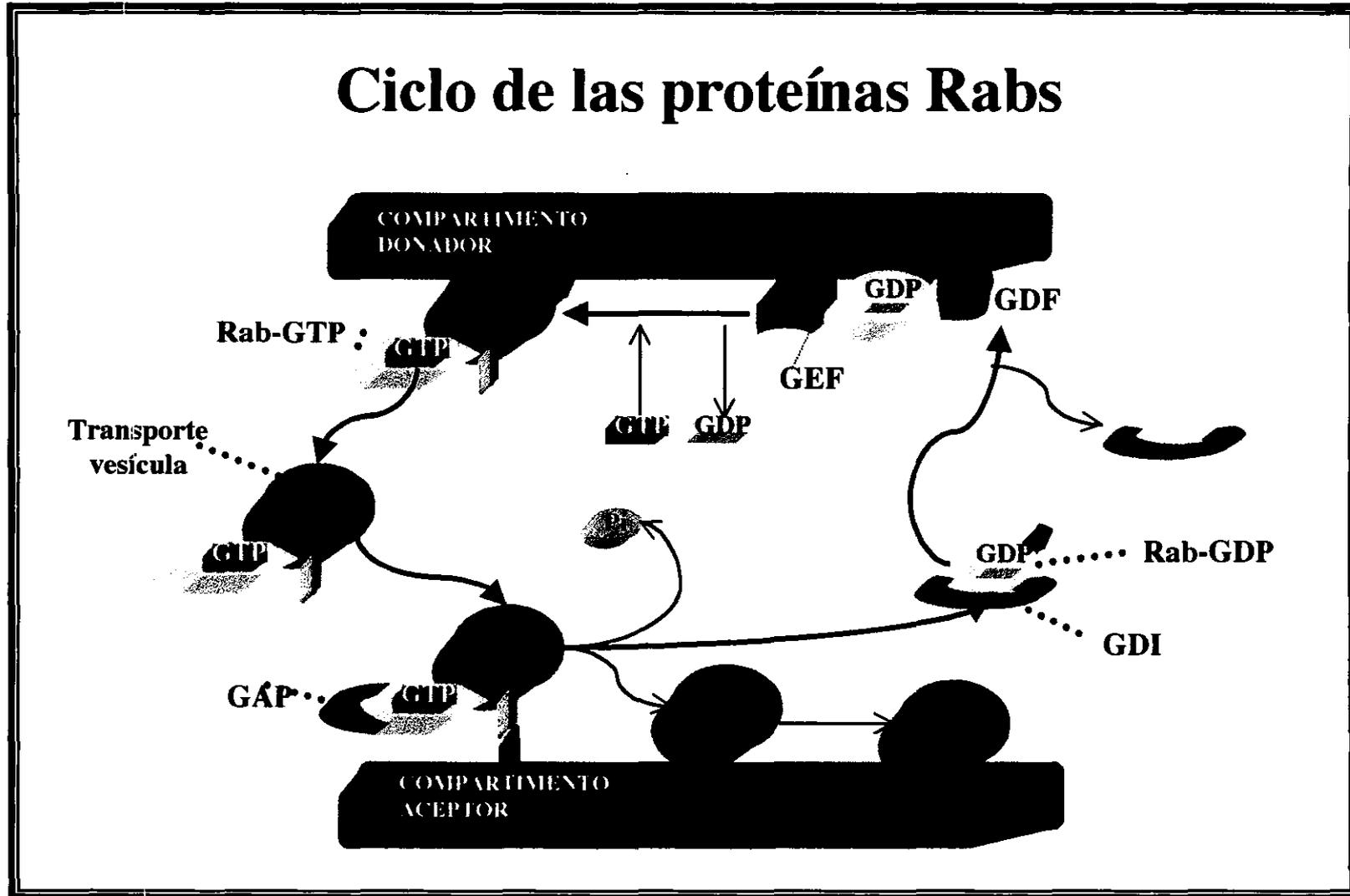


Figura 2. En amarillo se ilustra la proteína Rab. Las proteínas reguladoras del ciclo se muestran en la figura.

Estructura de la proteína ras

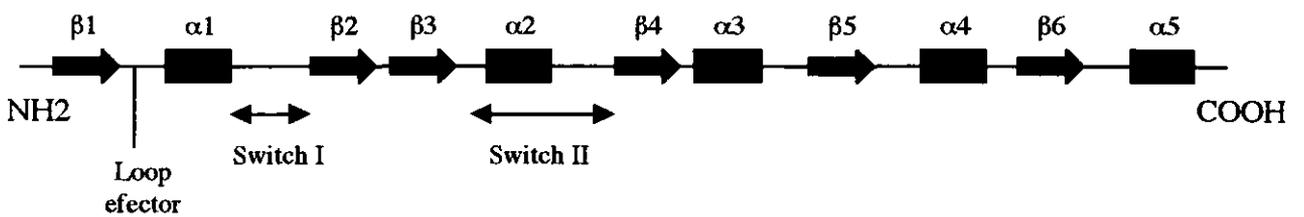
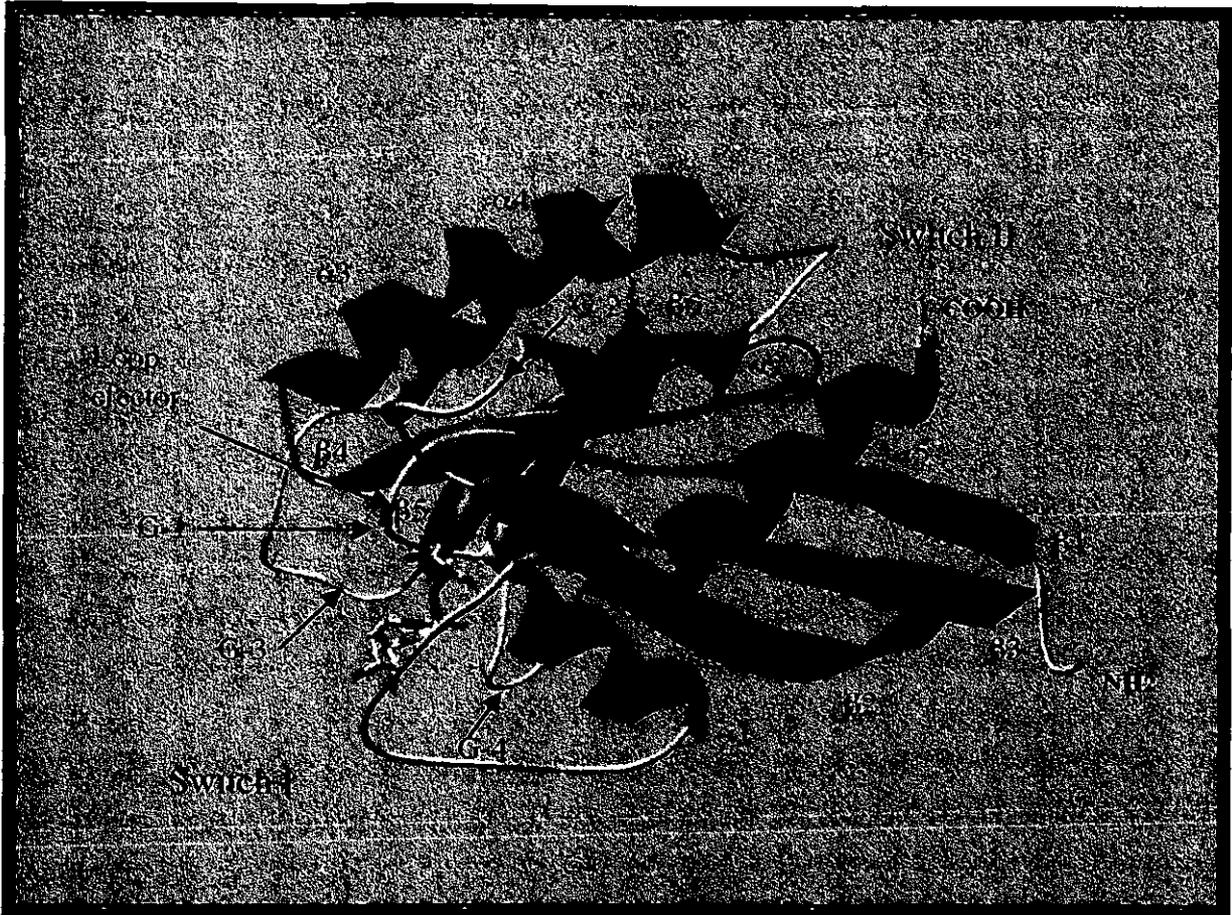


Figura 3. Muestra los elementos estructurales de la proteína ras, la localización de los motivos de unión a GTP se muestran en la Figura.

vesícula en proceso de fusión con el compartimento aceptor formando nuevamente el complejo Rab-GDP/GDI que recicla a la proteína Rab para que inicie nuevamente el ciclo.

1.4.1.3 Dominios conservados.

Todos los miembros de la superfamilia de las proteínas G, muestran un cuerpo estructural común, ejemplificado por la proteína p21 ras. La secuencia de las regiones de unión a GTP se encuentra muy conservada, lo cual sugiere un origen evolutivo común para estas proteínas. El sitio de unión a GTP de las GTPasas pequeñas esta formado por 4 motivos: el motivo G-1 (GXXXXGKS/T), ubicado en la cadena β 1 y la hélice α 1, une los fosfatos α y β del nucleótido guanidina (ver Figura 3); el motivo G-2 (WDTAGQE) se ubica en el amino terminal de la hélice α 2, funciona como subsitio de unión de Mg^{2+} y el fosfato γ de GTP; el motivo G-3 (NKXD), une la cadena β 5 y la hélice α 4, reconoce el anillo de guanina; y el motivo G-4 (EXSAK/L), se localiza entre la cadena β 6 y la hélice α 5, reforzando el reconocimiento de la base guanina [Sprang, 1997]. Otro elemento estructural importante es el loop efector localizado entre la hélice α 1 y la cadena β 2; forma parte del sitio de unión a Mg^{2+} y ha sido implicado como sitio de unión de proteínas efectoras tales como inhibidores o activadores y de la proteína GAP. [Marshall, 1993].

Recientemente, se reportó el análisis de la secuencia primaria de las proteínas Rab de mamífero conocidas hasta la fecha [Pereira-Leal and Seabra, 2000], en donde se proponen 5 regiones altamente conservadas, exclusivas entre las proteínas Rab que las diferencian de otras GTPasas pequeñas. Los motivos son RabF1 (IGVDF), RabF2 (KLQPW), RabF3 (RFRSIT), RabF4 (YYRGA) y RabF5 (LVYDIT). Estos motivos se encuentran muy cercanos, pero no se sobrelapan, a los motivos de unión a GTP.

1.4.1.4 Prenilación.

La prenilación de proteínas es definida como la reacción enzimática que realiza la unión covalente, a través de enlaces tio-eter, de grupos isoprenoides a residuos cisteína presentes en el carboxilo terminal de la proteína a modificar. Los

grupos isoprenoides pueden ser de dos tipos, farnesilo C15 o geranylgeranilo C20 [Seabra, 1998]. La prenilación es una modificación esencial para el funcionamiento de la proteína modificada, debido a que se requiere para su asociación a membranas y para la formación de interacciones específicas proteína-proteína.

Las proteínas Rab contienen dos residuos cisteína en o cerca del carboxilo terminal presentes en motivos tales como XXCC, XCXC o CCXX, Ambos residuos cisteína son modificados por la adición de grupos C-20 geranylgeranilo (GG) en una reacción catalizada por una Rab GGTasa ó GGTasa-II (Rab geranylgeranyl transferasa). Esta enzima es un heterodímero compuesto de una subunidad α de 60 kDa y una subunidad β de 38 kDa [Seabra and Shen, 1996]. La Rab GGTasa es única entre las prenyl transferasas ya que es incapaz de catalizar la reacción por sí sola, requiere de un componente adicional llamado "Rab escort protein" ó REP. REP se une a la proteína Rab no prenilada, la presenta a la Rab GGTasa y cataliza la geranylgeranilación en los residuos cisteína. Después de la geranilación, REP permanece unida a la proteína Rab. La proteína GDI se une al complejo Rab/REP formando un nuevo complejo llamado Rab-GDP/REP/GDI. Las proteínas GDI y REP son liberadas cuando la proteína Rab interactúa con su compartimento donador, la proteína Rab continúa su ciclo mientras GDI y REP son recicladas al citosol [Alexandrov *et al*, 1994].

La doble prenilación de las proteínas Rab es una característica única entre las proteínas preniladas. Una excepción a la digeranilación son las proteínas Rab8 y Rab13 de mamífero; estas proteínas son monogeraniladas ya que contienen sólo un residuo cisteína en un motivo CAAX y son modificadas por la geranylgeranyl transferasa tipo I, en ausencia de la proteína REP [Wilson *et al*, 1998].

La proteína Rab geranilada es mucho más hidrofóbica que otras proteínas preniladas, lo que explica por qué la proteína Rab prenilada requiere de una proteína REP que actúa como chaperona presentando la proteína Rab a la GGTasa y la escolta a la membrana celular después de la modificación [Seabra, 1998].

1.4.1.5 Interacciones Rab-SNARE y el tráfico vesicular.

A lo largo del tráfico vesicular entre los organelos de las vías secretoria y endocítica, la especificidad de los eventos de formación, transporte y fusión de vesículas a membranas debe ser cuidadosamente regulada, para evitar eventos inapropiados de fusión que pudieran repercutir en la organización de las membranas dentro de la célula. La hipótesis SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor) del inglés, propuesta por primera vez por Söllner *et al* (1993), establece que cada vesícula de transporte contiene en su superficie una proteína o varias proteínas integrales de membrana (v-SNARE) que especifican la membrana blanco o "target". Las membranas blanco poseen la contraparte (proteínas t-SNARE) que, al interactuar con las v-SNARE forman un complejo llamado SNARE que permite que se lleve a cabo el evento de fusión [Pfeffer, 1996].

Además de las SNARE, se requieren de otras proteínas para las etapas de "docking" y fusión. Estas proteínas caen dentro de dos clases: factores de una etapa específica de transporte y factores generales. En el primer grupo se incluye a las proteínas Rab cuya función es necesaria para la formación del complejo SNARE. Las proteínas Rab reclutan factores específicos de "docking" que facilitan la interacción de las proteínas v- y t-SNARE [Brennwald *et al*, 1994]. Entre los factores específicos ha sido caracterizada una nueva clase de proteínas llamadas Velcro; su función es incrementar la eficiencia del "docking" vesicular. Entre los factores generales se encuentran NSF (del inglés N-ethylmaleimide-sensitive factor; Sec18p en levadura), y α -SNAP (α -soluble NSF-attachment protein, Sec17p en levadura), las cuales actúan para desensamblar el complejo v- y t-SNARE antes de la fusión a membrana, ver Figura 4.

El complejo SNARE no permanece apareado todo el tiempo, es un proceso regulado. Existe una serie de proteínas que bloquean la accesibilidad de las proteínas v- y t-SNARE. Para que se pueda llevar a cabo el apareamiento se requiere de la liberación de las proteínas que bloquean el complejo y de cambios conformacionales. La proteína Sec1p, identificada en levadura, protege el sitio t-SNARE hasta que la v-SNARE en la vesícula llega para formar el complejo SNARE [Novick *et al*, 1980, 1981]. De la misma forma que t-SNARE, el sitio

Eventos de “Docking” en el Transporte Vesicular

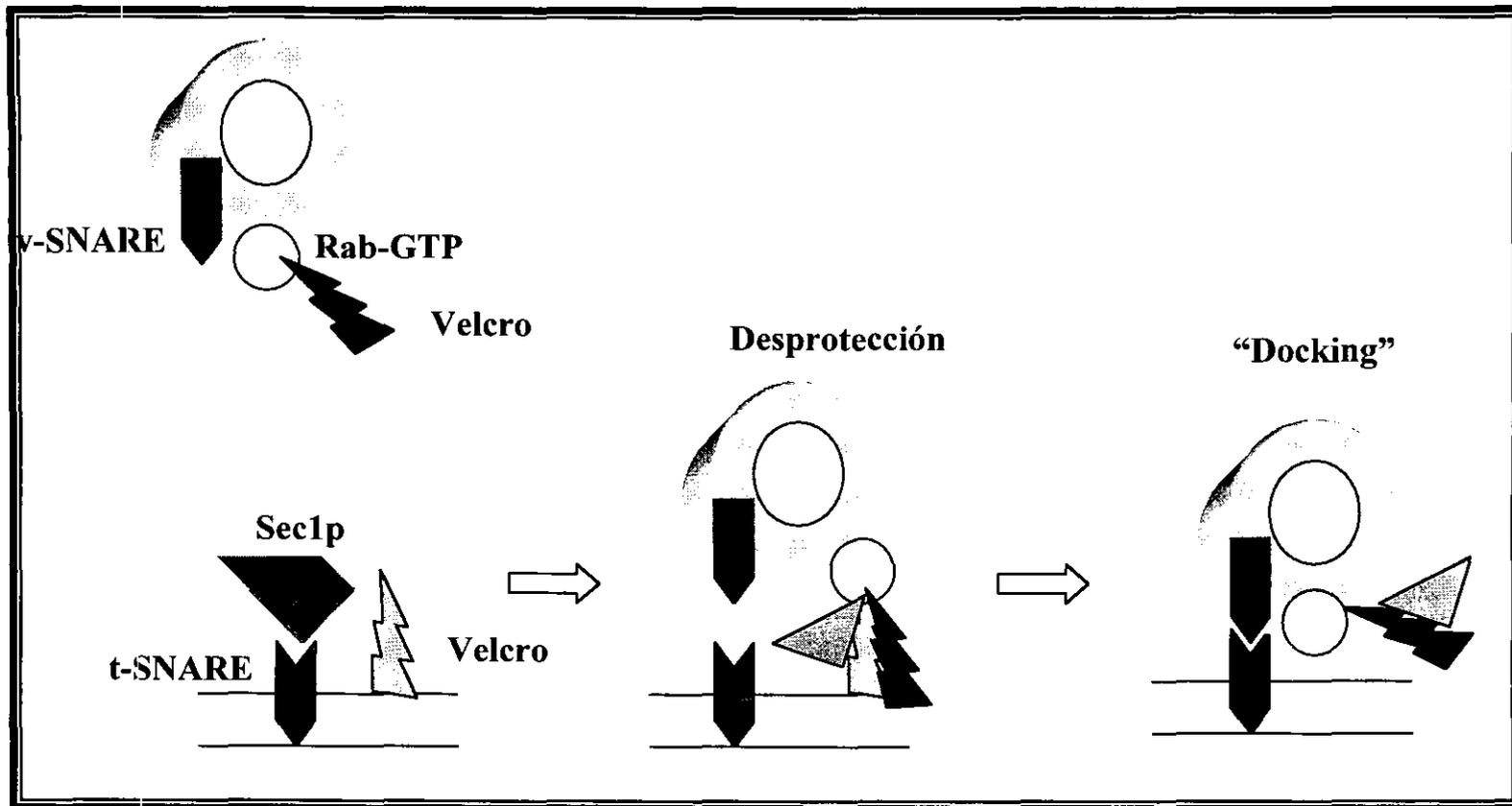


Figura 4. Modelo sugerido de “docking” vesicular. La proteína Rab-GTP recluta a los factores Velcro del citosol, estos factores aumentan la eficiencia del “docking” vesicular. La proteína Sec1p protege al t-SNARE; al interactuar con la proteína Rab y los factores Velcro, desprotege el sitio permitiendo la formación del complejo SNARE.

v-SNARE también es protegido, las proteínas VAM ("vesicle-associated membrane protein") son las encargadas de esta función [Calakos and Scheller, 1994].

1.5 Sec4p y Rab8.

Sec4p fue la primera GTPasa pequeña en ser implicada en el transporte vesicular [Salminen and Novick, 1987]. El gene SEC4 fue identificado en un tamizado de mutantes de levadura termosensibles defectivas en la secreción de proteínas [Novick *et al*, 1980]. La mutante *sec4-8* bloquea el transporte de proteína del aparato de Golgi a la superficie celular, pero no afecta el transporte en etapas más tempranas. La contraparte de Sec4p en mamífero es Rab8, estas proteínas presentan un alto porcentaje de identidad con las proteínas YPT1 de *Saccharomyces cerevisiae*, YPT2 de *Saccharomyces pombe* y SAS1 y SAS2 de *Dictyostelium discoideum* [Rothblatt *et al*, 1994]. La caracterización de Rab8 en células de mamífero se ha visto facilitada por experimentos de competencia funcional con péptidos sintéticos de secuencia específica y en experimentos de inhibición de la expresión del gene *rab8* con oligonucleótidos antisentido (de secuencia específica del gene *rab8*). Los estudios antes mencionados indican que Sec4p/Rab8 juega un papel importante en la regulación del tráfico vesicular del *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática [Hubert *et al*, 1993; Walworth *et al*, 1989].

La localización de Sec4p/Rab8 ha sido estudiada por métodos de inmunofluorescencia en microscopía confocal, inmunomicroscopía electrónica y fraccionamiento subcelular. La proteína se ha detectado soluble en el citoplasma, asociada a vesículas secretoras y asociada a la membrana plasmática [Hubert *et al*, 1993; Novick *et al*, 1981]. Por otro lado, se ha demostrado que en *S. cerevisiae*, Sec4p realiza un ciclo, en el cual la proteína Sec4p localizada en el *trans*-Golgi se une a vesículas recién formadas; posteriormente, las vesículas se fusionan con la membrana plasmática y entonces Sec4p es liberada y para ser reciclada al *trans*-Golgi a través del citoplasma y unirse a nuevas vesículas formadas [Ferro-Novick and Novick, 1993].

1.6 *Entamoeba histolytica* como modelo de estudio.

1.6.1 La amibiasis.

La amibiasis es una infección humana causada por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*. La forma motil del parásito, el trofozoito, usualmente vive como comensal en el lumen del intestino grueso, en donde se multiplica y diferencia en quiste, la forma infectiva, responsable de la transmisión de la infección. La forma más común de manifestaciones sintomáticas son la disentería y la diarrea, las cuales se presentan cuando *E. histolytica* invade la mucosa intestinal; en algunos casos, puede llegarse a complicaciones fatales como lesiones extraintestinales, principalmente abscesos hepáticos que si no son diagnosticados y tratados a tiempo pueden ser letales [Sepúlveda and Martínez-Palomo, 1984].

1.6.2 Distribución global de la amibiasis.

La amibiasis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Ha sido estimado que el 10% de la población global está infectada, y es la tercera causa de muerte por parásitos después de la malaria y la schistosomiasis [Walsh, 1986]. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo y representa un gran problema social y de salud en países en vías de desarrollo, particularmente en Asia, Africa y America Latina, en donde las condiciones sanitarias inadecuadas y la presencia de cepas virulentas de *E. histolytica* se combinan sosteniendo una alta incidencia de la infección [Martínez-Palomo, 1988]. En México, la amibiasis ocupa el primer orden de mortalidad por parásitos. Entre un 20 y 25% de la población podría estar infectada, de los cuales más del 8% ha sufrido por lo menos un episodio de amibiasis invasora como se determinó por ensayos de hemaglutinación indirecta en la última encuesta seroepidemiológica nacional [Caballero *et al*, 1994]. El estudio realizado sobre casi 70,000 sueros provenientes de toda la República Mexicana sugiere, con respecto a la anterior encuesta nacional [Gutierrez *et al*, 1976], que la incidencia de amibiasis invasora se incrementó en las últimas dos décadas en más del 2%. Sin embargo, y debido al desarrollo de tratamientos más eficaces, el nivel de mortalidad debido al parásito a disminuido significativamente, aun cuando los niveles de morbilidad se siguen manteniendo.

En las últimas décadas ha surgido la necesidad de estudiar los aspectos básicos de la biología del parásito. Los detalles de su maquinaria de tráfico de proteínas y tráfico vesicular está pobremente estudiado, por lo cual, el desarrollo de técnicas de biología molecular ofrece una alternativa valiosa para estudiar diversos aspectos de la fisiología y biología celular amibiana difíciles de abordar por otras técnicas.

1.7 Características de *Entamoeba histolytica*.

1.7.1 La célula.

Entamoeba histolytica es un eucariote unicelular morfológicamente simple, con una organización citoplásmica elemental (presencia de núcleos, vacuolas y numerosas vesículas). Su reproducción es asexual, se reproduce por fisión nuclear, seguida de división del citoplasma a lo largo en dos partes aproximadamente iguales. Su ciclo de vida comprende principalmente dos estadios: el trofozoito (forma invasiva) y el quiste (forma infectiva); el hombre es su único hospedero definitivo y carece de hospederos intermediarios. En la Figura 5 se ilustra el ciclo de vida de *E. histolytica*.

El trofozoito es una forma altamente dinámica que mide entre 10 y 40 μm . Las estructuras más notables en su citoplasma son el núcleo, numerosas vacuolas y pequeñas vesículas. No hay evidencia morfológica de algunas estructuras típicas en eucariotes, como son: citoesqueleto estructurado, mitocondria, peroxisomas y un sistema membranoso equivalente a complejo de Golgi y retículo endoplásmico (RE) de eucariotes superiores, en el mejor de los casos se ha visto pobremente desarrollado [Martínez-Palomo, 1986]. El desplazamiento lo lleva a cabo mediante pseudópodos y filopodios, y al desplazarse presenta en la parte posterior una región denominada uroide. El trofozoito se desprende de moléculas que interaccionan con proteínas de su superficie, como son los anticuerpos, envolviéndolas en la membrana y llevándolas al uroide; este fenómeno conocido como "capping" constituye uno de los principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune con que cuenta el trofozoito de *E. histolytica* [Arhets *et al*, 1995].

Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*

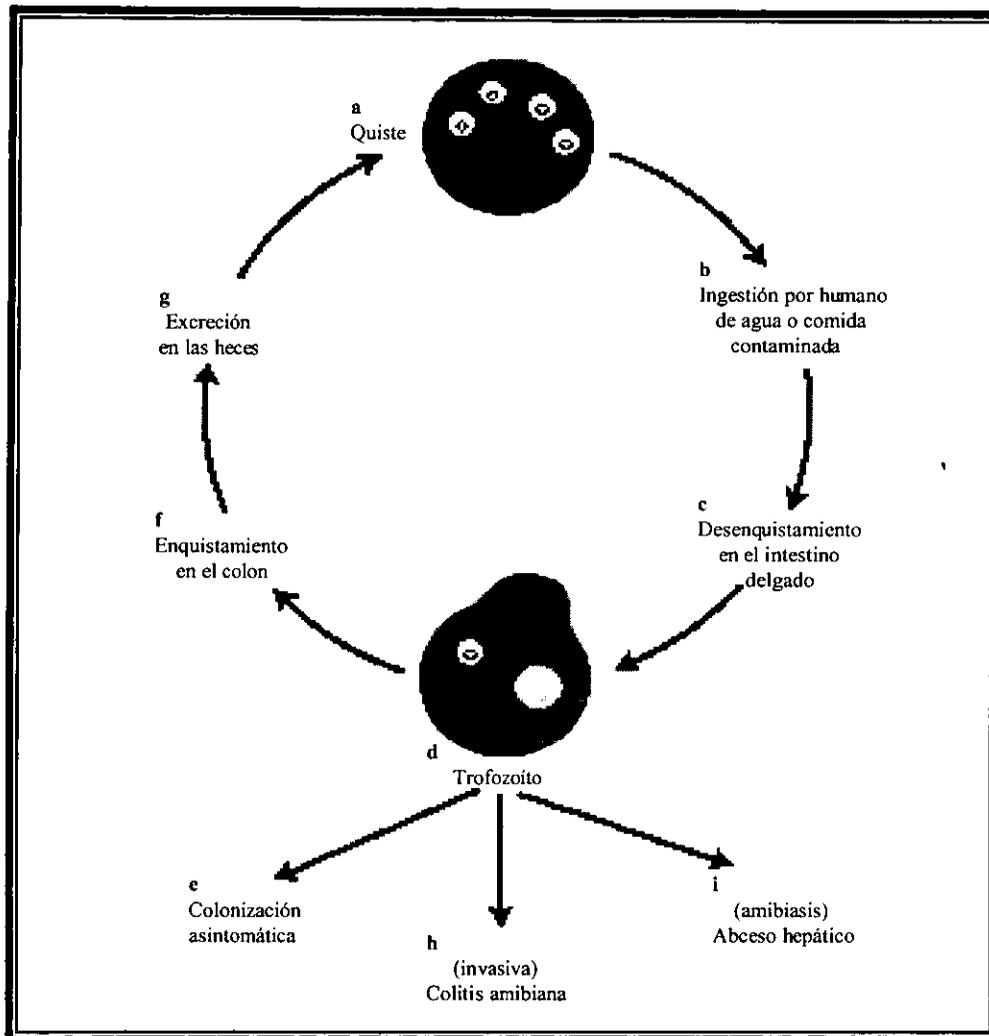


Figura 5. En la figura se indican las diferentes etapas del ciclo de vida de la amiba. En el inciso d se indican las diferentes formas de la infección que pueden ser adquiridas por el hombre.

El quiste es un cuerpo redondo de paredes gruesas, mide entre 8 y 20 μm de diámetro y dependiendo de su estado de madurez puede presentar entre 1 y 4 núcleos. La principal característica estructural del quiste es la presencia de una capa de recubrimiento de quitina que le confiere al parásito resistencia al medio ambiente y a la acción ácida de los jugos gástricos durante su paso por el estómago [Martínez-Palomo, 1986].

Desde un punto de vista bioquímico, el trofozoito presenta un metabolismo anaeróbico que se desvía, de manera importante, de los eucariotes más complejos. Por ejemplo, carece de hemoproteínas, glutatión, ciclo de Krebs y la vía colateral de las pentosas y su glicólisis no están reguladas alostéricamente. Con respecto a su vía secretoria, ha sido reportado que el trofozoito secreta activamente una variedad de proteínas, algunas de ellas involucradas directamente en el daño tisular al hospedero. Las proteínas de membrana plasmática, tales como la lectina Gal/Gal-Nac, así como otros componentes como los factores de virulencia localizados en vacuolas y lisosomas [McLaughlin and Aley, 1985] o en gránulos electrodensos [Muñoz *et al*, 1990] están involucrados en la patogénesis de la amiba.

Para caracterizar la maquinaria de secreción de *E. histolytica* dentro de un contexto evolutivo, nuestro grupo ha clonado y caracterizado genes amibianos cuyos productos son característicos de compartimentos de la vía secretora de eucariotes superiores. En el laboratorio se han clonado dos genes relacionados a la translocación de proteínas nacies al RE: SRP54 [Ramos *et al*, 1997] y la subunidad SEC61 alfa [B. Siminovich, Tesis de maestría, 1999]. SRP54 es un componente del complejo Partícula de Reconocimiento de Señal, mientras Sec61p alfa es una proteína integral del poro de translocación al RE. También se ha clonado un gene homólogo a la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la cual es necesaria para el folding apropiado de proteínas en el RE (dato no publicado), y un homólogo de STT3, una oligosacaril transferasa residente del lumen RE (dato no publicado). Igualmente, un marcador del cis-Golgi, el receptor ERD2, responsable de la captura de las proteínas residentes del lumen del RE que escapan al Golgi, ha sido caracterizado en el laboratorio (Sanchez-Lopez *et al*, 1998). Por último, contamos con un marcador de transporte vesicular homólogo a Rab8 descrito en esta tesis. Los datos obtenidos en el laboratorio junto con otros marcadores

reportados por otros grupos sugieren la existencia de equivalentes funcionales de compartimentos secretores tipo RE y Golgi en trofozoitos de amiba.

1.7.2 El genoma amibiano.

El núcleo del trofozoito es de 3-5 μm de diámetro. Durante la división nuclear la membrana nuclear permanece intacta por lo que la condensación cromosomal no es evidente [Meza *et al*, 1990]. La cromatina muestra una estructura típica de cuentas de rosario y está parcialmente organizada en partículas similares a nucleosomas [Torres-Guerrero *et al*, 1991; Föringer *et al*, 1993].

El genoma de *E. histolytica* tiene un bajo contenido en G+C (24%) y está compuesto de cromosomas lineales y de moléculas circulares (plásmidos). Los genes rRNA están localizados en moléculas de DNAs circulares extracromosomales. La estimación del tamaño del genoma por diferentes métodos ha fallado en la obtención de valores comparativos debido a la complejidad del organismo: un incierto nivel de ploidia, presencia de células multinucleadas y un ciclo de división celular pobremente marcado [Bhattacharya *et al*, 2000]. La mayoría de los genes reportados en amiba, carecen de intrones y aquellos identificados a la fecha son pequeños (menos de 100 nucleótidos). Los intrones de amiba muestran los elementos consenso de intrones de eucariotes, tales como las secuencias GU y AG localizadas en los sitios de "splicing" [Bhattacharya *et al*, 2000]. Las secuencias codificantes son ricas en A+T, especialmente en la tercera posición del codón. Las regiones intergénicas así como las regiones no traducidas 5' y 3' que flanquean los genes estructurales son usualmente cortas en comparación con el genoma de los eucariotes superiores. De igual forma, las secuencias reguladoras del inicio (ATTCA o ATCA) y término (TAA/TTT) de la transcripción, así como la secuencia tipo caja TATA (TATTTAAA) localizada comúnmente a 30 pb río arriba del inicio de la transcripción, difieren de las secuencias consenso de los genes de eucariotes [Bruchhaus *et al*, 1993].

1.7.3 Patogenicidad y mecanismo de invasión.

Diversos estudios han demostrado que la amiba coloniza el intestino grueso del hombre a través de un proceso activo de adherencia a la mucosa colónica e invasión del epitelio intestinal. Este proceso combina la habilidad motriz de la amiba para ponerse en íntimo contacto con la célula blanco y la participación de moléculas de superficie y de secreción que estabilizan la interacción. Entre las moléculas identificadas podemos citar la lectina Gal/GalNAc mediante la cuál la amiba se adhiere a las células del intestino del hospedero [Braga *et al*, 1992], las cisteín proteasas que degradan la matrix extracelular facilitando la invasión del trofozoito [Stanley *et al*, 1995] y otras moléculas líticas como fosfolipasas y péptidos formadores de poro o amebaporo [Ravdin, 1986; Leippe *et al*, 1991]. La actividad citolítica de la amiba no se puede ver como un factor individual sino como el resultado de una combinación de toxinas y enzimas liberadas, la motilidad activa del parásito, una particular actividad fagocítica y una eficiente maquinaria citoplásmica que degrada rápidamente los componentes extracelulares que ingiere [Martínez-Palomo, 1986].

1.8 Justificación del proyecto.

Las GTPasas pequeñas son proteínas altamente conservadas, desde mamíferos hasta levaduras; en parásitos también han sido identificados homólogos de estas proteínas. En los últimos años su estudio ha adquirido especial interés debido a la utilidad potencial de estas proteínas como herramienta para la manipulación de la vía de señalización, ciclo celular, citoesqueleto y tráfico de proteínas. De particular interés para varios laboratorios que trabajan en parásitos han sido las proteínas Rab, debido a que estas GTPasas están asociadas con pasos específicos del transporte vesicular a lo largo de la vía secretoria y endocítica, y de ahí su importancia como marcadores moleculares de estructuras subcelulares en estudios morfológicos y bioquímicos.

En el laboratorio del Dr. Alagón nos hemos enfocado en el desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de la biología molecular y celular de la ruta secretoria de este protozoario. De este modo, se han identificado marcadores moleculares de posibles compartimentos celulares tipo RE, aparato de Golgi y

vesículas de transporte terminales. Igualmente, se han desarrollado metodologías orientadas hacia la transfección estable de trofozoitos de amiba, la expresión de proteínas recombinantes en este parásito, el análisis de la distribución celular de proteínas y el estudio de la regulación de la ruta secretoria. El conocimiento generado puede contribuir al entendimiento de las relaciones parásito-hospedero y al desarrollo de métodos de diagnóstico más efectivos, terapias y herramientas profilácticas. Dadas las características que presenta la amiba, una de las preguntas más interesantes a resolver es si este parásito contiene un sistema equivalente a la maquinaria de secreción existente en otros eucariotes y de qué manera se encuentra regulado. La respuesta a esta pregunta podría aportar elementos en el conocimiento del desarrollo filogenético de las estructuras y moléculas que participan en el tráfico de proteínas.

II OBJETIVOS

Objetivo General

- Obtención, caracterización y expresión del gene rab8 de *Entamoeba histolytica*.

Objetivos Particulares

- Identificar y aislar el gene rab8 de *E. histolytica*.
- Realizar estudios comparativos entre la secuencia obtenida y secuencias del mismo gene en otras especies reportadas.
- Determinar el número de copias del gene rab8 presentes en el genoma de *E. histolytica*.
- Caracterizar la expresión del gene rab8 en amiba.
- Expresar la proteína recombinante His-EhRab8 y obtener anticuerpos policlonales contra la fusión.
- Citolocalizar la proteína Rab8 en amiba.

III MATERIALES Y METODOS

3.1 Buffers y Soluciones.

3.1.1 Para extracción y análisis de DNA.

- TBE 10X: Tris-HCl 89mM pH 8.3, ácido bórico 89 mM, EDTA 2mM
- TAE 1X: Tris-HCl 40mM, ácido acético glacial 30mM, EDTA 1 mM
- TE 10X: Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM
- TE-Sacarosa-Lisozima: Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM, sacarosa 25mM, lisozima 5mg/ml.
- Solución de lisis plásmidos: NaOH 0.2 N; SDS 1%
- Nonidet P-40 10%
- Sacarosa: Sacarosa 1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, KCl 24 mM, MgCl₂ 10 mM
- CHCl₃: Alcohol Isoamílico (24:1) (Sevag)
- Fenol: CHCl₃: Alcohol Isoamílico (25:24:1) (Fenol/Sevag)
- Bromuro de Etidio: a 10 mg/ml en agua bidestilada
- SSC 20X: NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3M pH 7
- Denhardt's 50X: Ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%

3.1.2 Para extracción y análisis de RNA.

- * Trizol (GIBCO -BRL)
- * H₂O-DEPC
- * MOPS 10X: MOPS 250mM pH 7, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM
- * Buffer de carga: MOPS 10X, formamida desionizada, formaldehído.

3.1.3 Para geles de proteínas.

- Solución de acrilamida: acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%
- Buffer separador: Tris 1.5 M, SDS 0.4% ajustar pH 8.8
- Buffer concentrador: Tris 0.5 M, SDS 0.4% ajustar pH 6.8
- Buffer de cargado 2X: glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris-HCl 50mM pH 6.8, 2-β Mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.002%

3.2 Cepas utilizadas.

- Se utilizaron trofozoitos de la cepa HK9 de *Entamoeba histolytica* cultivados en condiciones axénicas en el medio BI-S-33 a 37° C. (Diamond *et al*, 1978).
- Se utilizó la cepa XL1Blue de *E. coli* para las clonaciones realizadas y para la expresión de la proteína His-*EhRab8*.

3.3 Medios de Cultivo.

LB

Para crecimiento de *E.coli* (base 1 L)

NaCl	10 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Bacto-agar (en caso de medio sólido)	15 g

Autoclavear 20 min. a 120° C.

BI-S-33 [Diamond *et al*, 1978]

Para cultivo de amibas

Peptona de Bictriptasa	3.65%
Dextrosa	1.21%
NaCl	1.243%
KH ₂ PO ₄	0.073%
K ₂ HPO ₄	0.121%
L.cisteína hidroclicorada	0.121%
Acido ascórbico	0.024%
Citrato de amonio férrico	0.0057%

Después de esterilizar se adiciona 15% de suero de ternera (inactivado) y 3% de vitaminas-Tween 80.

NZY

Para tamizado y escisión de fagémidos.

NaCl	5 g
MgSO ₄	5 g
Ext. Levadura	5 g
Peptona de Caseína	10 g

Agar (medio sólido)	15 g
Agar suave	1.4 g

3.4 Plásmidos utilizados.

pBSSK (pBluescript SK- Stratagene) Vector de 2958 pb utilizado en las clonaciones de DNA en *E. coli*, en general.

pQE30 (QIAGEN) Vector de 3463 pb para expresión de proteínas en *E. coli*.

3.5 Marcadores de peso molecular.

Para DNA: marcadores de alto peso molecular λ -HindIII (Boehringer-Manheim, México). Tamaños en pb 23130, 9416, 6557, 4361, 2332, 2027, 564.

Para proteínas: marcadores de alto peso molecular preteñidos (Amersham, Alemania)

miosina 220 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, albúmina sérica bovina 66 kDa, Ovoalbúmina 46 kDa, Anhidrasa carbónica 30 kDa, Inhibidor de tripsina 21.5 kDa, lisozima 14.3 kDa.

3.6 Oligonucleótidos utilizados en los experimentos referidos en esta tesis.

Oligonucleótidos universales de pBSSK

Oligo T3 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

Oligo T7 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Oligo de T (Oligo AUAP-B) del Kit de 3' RACE de Gibco BRL modificado en el laboratorio con la adición de un sitio *Bam*HI en el 3'.

Oligo AUAP-B

5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATCC-3'

Oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de *Ehrab8*.

Rab 8.1 5'-AAACTATTACTCATTGGAGAAAG-3'

Rab 8.2 5'-CTTGATACAATAGTTCTAAATCG-3'

Rab 8.3 5'-CGATTTAGAACTATTGTATCAAG-3'

Rab 8.4 5'-GCAGGGATCCTCGGAGAAGGATTCAACAAT-3'

Rab 8.5 5'-CCCAAAGCTTTTAAACAACATCCAGTTGATTC-3'

Rab 8.6 5'-GCAGGGATCCGCACGTGATGTTATTC-3'

3.7 Software utilizado.

Oligo 4.0

GeneWorks version 2.5.1 (IntelliGenetics, Inc.).

Gene Construction Kit(tm)

Adobe Photoshop(tm) 2.5.1

EditView 1.0.1

NIH/Object Image 1.62 f

Voxel View (Vital Images, Inc)

3.8 Cultivos celulares.

Los trofozoitos de amibas se cultivaron en medio BI-S-33 a 37° C en tubos de 10 ml de vidrio (Diamond *et al*, 1978). Se realizaron resiembras cada 48 horas para mantener las células en fase logarítmica. Para los cultivos en escala se utilizaron botellas de 200 ml conteniendo medio BI-S-33, las botellas se inocularon con 1×10^6 amibas y se crecieron a 37° C.

3.9 Obtención de la secuencia completa del gene *Ehrab8*.

3.9.1 Tamizado.

Para aislar clonas positivas que contuvieran el gene *EhRab8*, se infectaron 600 µl de bacterias XLI-Blue en MgSO₄ 10 mM con 100µl de fagos (provenientes del banco genómico de *Entamoeba histolytica*, cepa HMI:IMSS, construido en λZapII por el Dr. Ruy Perez-Monfort del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM) a 2×10^5 ufp/ml, se incubaron a 37° C por 15 min. Se adicionaron 8 ml de NZY-agar suave a 55° C, se dejó solidificar y se incubó a 37° C aproximadamente 12 horas hasta la aparición de las placas líticas. Las placas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa por duplicado, 2 min el primer filtro y 4 min el segundo. Se desnaturalizaron los filtros utilizando una solución de NaCl 1.5 M + NaOH 0.5 N por 2 min y se neutralizaron utilizando una solución de NaCl 1.5 M + Tris-HCl 0.5

M pH 7.5 por 5 min. Se lavaron los filtros con Tris-HCl 0.2 M pH 7.5 + SSC 2 X durante 30 segundos y se secaron sobre papel absorbente por 2 horas. El DNA se fijó a un filtro a 80° C utilizando vacío durante 2 horas. Se prehibridaron los filtros en la solución de prehibridación a 42° C toda la noche. Se desnaturalizó la sonda radioactiva ($1-2 \times 10^6$ cpm/ml) en presencia de ssDNA (100mg/ml) a 100° C/5 min y se agregó la sonda desnaturalizada a la solución de hibridación. Los filtros se hibridaron a 42 °C durante toda la noche. Se lavaron los filtros 1 vez con 2X SET (NaCl 0.1 N, Tris-HCl 0.03 M, EDTA 2 mM) 30 min a temperatura ambiente, 3 veces con 2X SETS (50 ml SET 20X, SDS 20%) 30 min a temperatura ambiente y 1 vez a 50° C con 2X SETS/30 min. Por último se expusieron los filtros en cassette PhosphorImager.

3.9.2 Escisión del fagémido.

Para la liberación del fagémido contenido en las clonas positivas del tamizado, se inocularon bacterias *E. coli* XL0LR en medio NZY y *E. coli* XLI-Blue en LB suplementado con maltosa 0.2% y MgSO₄ 10 mM. Las células se incubaron toda la noche a 30° C. Se centrifugaron los cultivos a 1000 xg y se resuspendieron las células a una densidad óptica igual a 1.0 a 600 nm en MgSO₄ 10 mM (aprox. 8×10^8 bact./ml). En un tubo falcon de 15 ml se agregaron: 200 µl de XLIBLue en MgSO₄ 10 mM, 250 µl de los fagos ($>1 \times 10^5$ partículas de fagos) a escindir, 1 µl de fago helper ExAssist ($>1 \times 10^6$ ufp/µl) y se incubó a 37° C durante 15 min. Se agregaron 3 ml de medio NZY y se continuó la incubación a 37° C por 3 horas mas con agitación. Después de la incubación se calentó el tubo a 65-70° C durante 20 min y se centrifugó a 1000 xg durante 15 min. Se separó el sobrenadante en un tubo de 15 ml estéril (el sobrenadante contiene el fagémido pBluescript-inserto escindido y empacado como partículas de fago filamentoso). Se guardó a 4° C. Para el plaqueo de los fagémidos escindidos, se pusieron 200 µl de células XL0LR en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 100 µl del sobrenadante con fagémidos escindidos a un tubo y 10 µl al segundo, se incubó a 37° C durante 15 min. Se agregaron 300 µl de medio NZY y se incubó a 37° C durante 45 min. Por último se plaquearon 200 µl en cajas LB-Ampicilina (50 mg/ml) y se incubó toda la noche a 37° C.

3.9.3 Clonación, Transformación y Secuenciación.

Las clonaciones se realizaron en el vector pBSSK (-), las condiciones de clonación fueron las siguientes: relación molar 1:10 de vector e inserto (1 mol de vector por 10 moles de inserto), buffer de ligación 1 X final, 1 μ l T4 DNA ligasa (1 unidad/ μ l) y tH₂O hasta un volumen total de 10 μ l, la reacción se dejó a 16° C toda la noche. Las transformaciones se llevaron a cabo por choque térmico: 100 μ l de bacterias competentes XL1 blue por 5 μ l de reacción de ligación, las bacterias a transformar se pusieron en hielo 30 seg, se dió el choque térmico a 37° C por 90 seg y se adicionó 900 μ l de medio SOC. Las células se recuperaron incubandolas 1 h a 37° C con agitación.

La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI Prism (Perkin-Elmer, USA) utilizando primers específicos dentro de la secuencia del gene rab8 y primers universales Fw, Rv, T4 y T7 contenidos en el plásmido pBSSK (-).

3.9.4 3' RACE.

Preparación de cDNA. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 500 ng de mRNA poly A (+), 10 pmoles de oligo (dT o específico) y se llevó a 12 μ l con tH₂O-DEPC, se mezcló brevemente y se incubó 10 min a 70° C y después un min en hielo. Se agregaron los siguientes reactivos (reactivos RNase free) 2 μ l buffer PCR 10 X, 1 μ l dNTP's 10 mM, 2 μ l MgCl₂ 25 mM, 2 μ l DTT 0.1 M, se mezcló y se preincubó a 42° C por 5 min. Se agregó 1 μ l de transcriptasa reversa (Superscript II/BRL) y se incubó a 42° C por 50 min. Se inactivó la enzima a 70° C por 15 min. Se dejó el tubo en hielo un minuto y se agregó 1 μ l de RNase H de *E.coli* por último se incubó a 37° C por 20 min. El cDNA se guardó a - 20° C.

Amplificación por PCR. Como templado se utilizaron 3 μ l cDNA en 25 μ l de reacción, como primers se utilizaron un oligo específico dentro de la secuencia de *EhRab8* (10 pmoles) y un oligo dT (10 pmoles), 5 μ l buffer PCR 10 X, 3 μ l MgCl₂ 25 mM, 1 μ l dNTP's 10 mM, 0.5 μ l Taq DNA polimerasa. Se mezclaron los componentes de la reacción y se amplificó por PCR. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron: 94° C 2 min; 35 ciclos de 94° C 1 min, 50° C 1 min,

72° C 1 min y 72° C 7 min. Se realizó una segunda amplificación utilizando como templado el producto obtenido de la 1a. amplificación, utilizando un oligo interno de la secuencia conocida de *Ehrab8* y un oligo dT, se utilizaron las mismas condiciones de amplificación que en la reacción descrita anteriormente.

3.9.5 5' RACE

Pegado de etiqueta de G's al 5' del cDNA. Se tomaron 20 µl de cDNA y se llevaron a 75 µl con tH₂O, se agregaron 3 µl de azul de bromofenol para seguir la reacción y se cargó la mezcla en una columna de Sephadex G5 (se puede usar una jeringa). La columna se centrifugó a 1000 xg por 2 min a temperatura ambiente, se colectó la fracción y se agregaron 100µl de tH₂O a la columna. Se agregaron 50 µl de tH₂O a la columna y se centrifugó nuevamente guardando la fracción. Se mezclaron las fracciones colectadas (aprox. 200 µl) y se concentraron con n-butanol (una extracción con 300 µl). Se precipitó en presencia de 3 µl de glicógeno (10 mg/ml), un décimo de vol. de NaOAc 3 M pH4.8 y 2.5 vol etanol toda la noche a -20° C o 30 min a -70° C.

Amplificación por PCR. Como templado se tomaron 3 µl de cDNA-dGn en 25 µl de reacción, como primers se utilizaron 10 pmoles de un oligo específico dentro de la secuencia de *EhRab8* y un oligo dC (15mer), 5 µl buffer PCR 10 X, 3 µl MgCl₂ 25 mM, 1 µl dNTP's 10 mM, 0.5 µl Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 94° C 3 min; 30 ciclos de 94° C 1 min, 42° C 1 min, 72° C 1 min y 72° C 7 min. Se realizó una re-amplificación utilizando como templado el producto obtenido de la amplificación por 5' RACE, un oligo interno de la secuencia conocida de *Ehrab8* y un oligo dC15, las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 94° C 3 min; 30 ciclos de 94° C 1 min, 50° C 1 min, 72° C 1 min y 72° C 7 min.

3.10 Extracción de DNA total amibiano por gradiente de Sacarosa.

Cultivo y aislamiento de amibas. Las amibas se crecieron hasta fase logarítmica (aproximadamente 48 hrs utilizando un inóculo de 1 X 10⁶ amibas en 200 ml de cultivo). Se utilizaron 4 botellas con 200 ml de cultivo. Las botellas se pusieron en agua-hielo durante 10 min y se agitaron frecuentemente para despegar las amibas

de las paredes de la botella. Se centrifugó en tubos "Corex" de 50 ml estériles a 500 xg por 10 min a 4° C. Se eliminó casi todo el sobrenadante por vacío dejando solo un poco para resuspender las amibas. Se mezclaron las amibas de los 4 tubos Corex y se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml, se lavaron con 50 ml de medio BI sin suero, se centrifugó a 500 xg por 10 min a 4° C y se eliminó el sobrenadante.

Lisis de los trofozoitos. Se añadió 1 ml de buffer de lisis frío a la pastilla de amibas, se resuspendió suavemente y se agregó a la pastilla 150 µl de 10% Nonidet P-40, se agitó 30 seg. Se observaron los núcleos de los trofozoitos lisados al microscopio para verificar la lisis.

Lisis y digestión de los núcleos. En un tubo Corex de 30 ml se preparó un colchón de 10 ml de sacarosa 1 M, se enfrió en agua hielo y se aplicó a este tubo el lisado amibiano. Se centrifugó el tubo a 4° C a 6 200 rpm por 12 min. Se removió el sobrenadante, removiendo primero el lisado amibiano y después el colchón de sacarosa. La pastilla de núcleos se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, KCl 24 mM, MgCl₂ 10 mM, espermidina 0.6 mM, ácido iodoacético 5 mM) y se aplicó a un tubo Corex de 15 ml que contenía 5 ml de sacarosa 1 M, se centrifugó a 6 200 rpm por 7 min y se removió el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 3 ml de buffer de digestión, se añadió 1 mg de Proteinasa K, se tapó el tubo con parafilm y se incubó a 37° C durante 1.5 hrs.

Extracción del DNA. Se añadió al tubo que contiene los núcleos lisados 3 ml de fenol-cloroformo-isoamílico, se mezcló suavemente hasta lograr una suspensión homogénea. Se separaron las fases centrifugando a 4° C a 1500 xg por 10 min. Se removió la fase acuosa con una pipeta Pasteur recortada y se transfirió a un tubo Corex de 15 ml, se adicionaron 20 µl de RNasa (10 mg/ml). Se repitió la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico. La fase acuosa de la última extracción se transfirió a un tubo Corex de 15 ml (esta fase contiene el DNA). Al tubo se le añadió 1 ml de etanol frío para precipitar el DNA, se mezcló y centrifugó el tubo y se removió el sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó 1 ml de etanol 70%, se invirtió 3 veces, se centrifugó y se removió el sobrenadante. Se repitió el lavado con 70% etanol, se eliminó el etanol y se añadió 400 µl de TE estéril para disolver el DNA.

3.11 Ensayo fluorométrico para cuantificar DNA con YOPRO-1.

Para el ensayo se preparó un stock de Yopro-1 a 1 mM en DMSO 1:4 (PM: 629) y se utilizaron placas: NUNC HRP de 96 pozos. Se hizo una dilución fresca de Yopro-1 a 1 μ M con Buffer TAE 1X. En cada pozo se agregaron los reactivos en el siguiente orden: buffer TEA 1X, 45 μ l de YOPRO-1 a 1 μ M, muestra de DNA a cuantificar, el volúmen final de la reacción fué de 200 μ l por pozo. Se midió la fluorescencia en el lector automático del Cytofluor 2300 usando las siguientes condiciones: placa NUNC HRP; Ex Filter: B 491 nm; Em Filter: B 509 nm; Sensitivity: 4.

Se hizo una curva estándar con cantidades conocidas del plásmido pBR328, con los datos se hizo una regresión lineal y se interpolaron los valores obtenidos de las muestras para conocer la cantidad de DNA presente en estas.

3.12 Marcaje radioactivo de sonda.

Para marcar la sonda se utilizó el protocolo propuesto por el Kit Multiprimer DNA labelling system de Amersham, para la reacción de radiomarcaje se utilizaron: 50 ng del fragmento a marcar, 4 μ l dATP, 4 μ l dTTP, 4 μ l dGTP, 5 μ l buffer 10X, 5 μ l BSA primer, 3 μ l dCTP, 2 μ l Klenow en un volumen final 50 μ l ajustar con tH₂O. Se incubó a 37° C 30 min y después 30 min a temperatura ambiente. Se pasó la sonda marcada por una columna con Sephadex G-50 para quitar los nucleótidos que no se incorporaron. Se midió la radiactividad incorporada (cpm) y se calculó la actividad específica (cpm/ μ gr DNA).

3.13 “Southern blot”.

Se utilizaron 15 μ g de DNA genómico de amiba, se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI*, *SpeI*, *BamHI* y *HindIII*. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa. Se fotografió el gel poniendo una regla fluorescente junto al gel para ubicar la posición de las bandas. Se sumergió el gel en 250 ml de HCl 0.25 M durante 20 min con agitación suave. Se desnaturalizó el gel en 250 ml de NaOH 0.4 M por 30 min. Se transfirió el gel toda la noche utilizando como buffer de transferencia NaOH 0.4 M. El filtro se lavó con 200 ml de NaOH 0.4 M por 10

min. Se neutralizó el filtro con 200 ml de solución de neutralización (Tris-HCl 0.2 M pH 7.5-8.0, SSC 0.1X, SDS 0.5%) por 10 min. Se secó la membrana a temperatura ambiente. El DNA se fijó a la membrana mediante un pulso en el Stratalinker. Se colocó el filtro en 30 ml de solución de prehibridación (formamida 50%, SSC 5X, Denhardt's 1X, SDS 0.25%) durante 4 hrs a 68° C. Se desnaturalizó la sonda a 100° C durante 5 min. Se hibridó el filtro en 30 ml de solución de hibridación más la sonda radioactiva desnaturalizada, durante toda la noche a 68° C. Se hicieron 2 lavados en 50 ml de SSC 2 X / SDS 0.1 % durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave, 2 lavados en 50 ml de SSC 0.1 X / SDS 0.1% durante 15 minutos a 68° C con agitación suave. Se expuso el filtro en cassette PhosphorImager.

3.14 Extracción RNA total amibiano.

Se utilizaron 8 botellas de amibas de 200 ml, se colectaron las amibas en medio BI a 1000 xg por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó al precipitado 10 ml de TRIzol (5%), se lisaron las células con vórtex 1 min, se dejaron en trizol por 6 hrs a 4° C. Se adicionaron 2 ml de CHCl₃. Se dejó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 xg por 10 min a 4° C. Se separó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 xg por 10 min a 4° C, se lavó el precipitado con etanol al 75%, se eliminó el etanol y se disolvió en 2 ml de H₂O-DEPC.

3.15 Preparación de RNA Poli A (+).

Se resuspendieron 0.5 g de oligo dT-celulosa en 1 ml de NaOH 0.1 N. Se pasó la suspensión de oligo dT-celulosa a una columna BioRad de 10 ml y se lavó con 3 vol. de tH₂O-DEPC y 5 vol. 1X Binding buffer-0.1% SDS para equilibrar. Se resuspendió el RNA en tH₂O-DEPC estéril y se desnaturalizó a 65° C por 15 min. Se incubó el tubo en hielo un minuto y se agregó un vol. de Binding buffer 2X -0.2% SDS. Se aplicó el RNA a la columna y se colectaron fracciones de aproximadamente 500 µl (3-4 tubos). Se desnaturalizó el RNA de las fracciones colectadas a 65° C/15 min y se pusieron los tubos en hielo. Las fracciones de RNA desnaturalizado se aplicaron nuevamente a la columna y se colectaron fracciones de 1 ml (RNA Poli A-). Se lavó la columna con 10 vol. de 1X Binding buffer-SDS

0.1% y 5 vol de buffer de lavado. Se eluyó la columna con 5 vol de EDTA 2 mM y se colectaron fracciones de aproximadamente 500 μ l (RNA Poli A+). Se leyó la densidad óptica de las fracciones colectadas a 260 nm. Se seleccionaron las fracciones de elución y se ajustó a una concentración final de LiCl 0.5 M-SDS 0.1% y se volvieron a pasar por la columna para aumentar su pureza. Por último se precipitaron las fracciones de RNA con etanol en presencia de 0.18 M de $MgCl_2$ a $-20^\circ C$.

3.16 “Northern blot”.

Se utilizó material esterilizado y horneado. El peine, la charola para el gel y el sistema de electroforesis se trató con NaOH 0.1 M durante toda la noche. Se preparó un gel de agarosa 1.2% / 2.2 M formaldehído, se fundió la agarosa y se dejó enfriar en un baño a $65^\circ C$ durante 15 min. Se agregaron 34 ml de formaldehído (2.2 M) y se mezcló suavemente hasta homogeneidad. Las muestras de RNA se prepararon respetando el siguiente orden: Buffer de carga 30.4 μ l, tH_2O -DEPC volumen final 40 μ l, 1 μ g de RNA, las muestras se desnaturalizaron a $65^\circ C/5$ min, se pasaron a hielo y se agregó a cada muestras 3 μ l de azul de bromofenol en formamida. Se cargó el gel inmediatamente y se corrió a 100-150 V. Se lavó el gel en aproximadamente 200 ml de dH_2O -DEPC/40 min (2X). Se cortó el carril que contiene los marcadores de peso molecular y se tiñó con 50 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml / acetato de amonio 0.1M durante 45-60 min. Se destiñó con acetato de amonio 0.1M durante 5 hrs. El gel (con las muestras a transferir) se equilibró en SSC 10X por 40 min. Las muestras se transfirieron a una membrana de nylon Hybond N+ con SSC 10X toda la noche. Se lavó la membrana brevemente en SSC 6X y dejó secar al aire. El RNA se fijó a la membrana usando 2 pulsos de 2 minutos en el Stratalinker y se hibridó con la sonda específica.

3.17 Expresión de la proteína recombinante His-*EhRab8*.

3.17.1 Clonación del gene *Ehrab8* en un vector de expresión.

A partir de cDNA de amiba se amplificó la secuencia completa del gene *Ehrab8* utilizando los primers: 8.4 (5' GCAGGGATCCTCGGAGAAGGATTCAACAAT

3') y 8.5 (5' CCCAAAGCTTTTAACAACATCCAGTTGATTC 3'), las condiciones de amplificación fueron: 94° C : 3 min; 30 ciclos de 94° C 1 min, 50° C 1 min, 72° C 1 min y 72° C por 7 min. El producto de PCR se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. El plásmido pQE30 (QIAGEN) se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, se desfosforiló y se utilizó para la reacción a una relación molar 1:10, 1 mol de plásmido pQE30 por cada 10 moles de inserto *Ehrab8*, buffer de ligasa 1 X final (1 unidad/ μ l), 1 μ l T4 ligasa en un volumen final de 10 μ l, la reacción se dejó a 16° C toda la noche.

3.17.2 Expresión de His-*EhRab8* en *E.coli* cepa XLI Blue.

Para la expresión de las clonas que contenían la recombinante, se creció un preinóculo en 1.5 ml LB + 1.5 μ l Amp (80 μ g/ml) toda la noche a 37° C. Del preinóculo se tomaron 500 μ l y se inocularon 4.5 ml de LB + 4.5 μ l Amp, se incubó a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6-0.8 a 600 nm, aproximadamente 2 hrs. Se indujo la expresión de la proteína añadiendo al cultivo 1 mM de IPTG (inductor del promotor lac contenido en el vector de expresión pQE30). Se incubó 2 hrs mas a 37° C. Se tomó 1 ml de cada cultivo y se centrifugó 1 min a 14, 000 xg, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 50 μ l de pBS 1X, se adicionaron 50 ml de buffer de carga 2X + β -mercaptoetanol, se lisaron las células con vortex, se hirvieron a 100° C por 10 min y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15%.

3.17.3 Purificación de His-*EhRab8*.

Para expresar la proteína His-*EhRab8* en un volumen de 100 ml de cultivo se colectaron las células en 2 tubos Falcon de 50 ml, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4° C. Se añadió a cada tubo solución de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM pH 8 , NaCl 300 mM, imidazol 10 mM) 5 ml/g de peso húmedo y se lisaron por sonicación. Se tomó muestra del lisado para el control de proteína total y se centrifugó a 10,000 xg por 10 min. Se separó el sobrenadante (fracción soluble) y se le añadió 1 ml de resina NTA-Ni al 50% previamente homogeneizada, se mezcló en el nutator 30 min a temperatura ambiente. Al precipitado (fracción insoluble) se le agregó el volumen inicial de solución de lisis y se resuspendió. La resina incubada con el sobrenadante se empacó en una columna de 5 ml. Se lavó

10 veces con solución de lavado (NaH_2P_0_4 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20mM) y se eluyó con solución de elusión (NaH_2P_0_4 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 250mM), recolectando en fracciones de 0.5 ml. Se midió la densidad óptica de las fracciones a 280 nm para cuantificar proteína. Las fracciones se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15%.

3.18 Expresión de la proteína HGFPCOOHRab8.

Las últimas 150 pb del 3' del gene *EhRab8* se clonaron en los sitios *Bam*HI/*Hind*III del vector de expresión pQE30. El fragmento clonado se amplificó por PCR utilizando un oligo interno de la secuencia y el oligo 8.5. Las condiciones empleadas para la amplificación y la clonación fueron las mismas que se utilizaron para la clonación del gene *EhRab8* en el vector pQE30. La expresión y la purificación de la proteína de llevaron a cabo de igual forma.

3.19 Electroforesis de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis de la proteína se realizó en geles SDS-PAGE al 15%, según la técnica descrita por Laemmil (1970). Como buffer de corrida se utilizó Tank buffer (Tris 25mM, glicina 19 mM, SDS 0.1%), los geles fueron teñidos con solución de tinción (metanol 10%, ácido acético 10%, azul de Coomassie 0.2%). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara "Tall Mighty Small" de BIO-RAD. Los geles para analizar anticuerpos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa por transferencia semihumeda para su análisis por Western blot.

3.20 Producción de anticuerpos policlonales.

3.20.1 Preparación del inmunógeno.

En un principio se utilizaron 100 μg de antígeno por conejo, después de analizar el título se aumento a 200 μg . El antígeno se mezcló con 500 μl de adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inmunización ó adyuvante incompleto de Freund (AIF) en el caso de las restantes. Se llevó a 1 ml con PBS 1X, la mezcla de pasó por un sistema de jeringas hasta obtener una emulsión homogénea.

3.20.2 Producción de anticuerpos policlonales.

Los anticuerpos anti His-*EhRab8* se obtuvieron en 2 conejos de la especie Nueva Zelanda. Se inocularon los conejos por un periodo aproximado de 3 meses, se tomaron muestras de sangre para evaluar el título de los anticuerpos por ELISA, los conejos se sangraron a blanco una vez que habían alcanzado un buen título de anticuerpos (por arriba de 50,000).

3.20.3 Procesamiento de sueros.

Se dejaron coagular las muestras de los sangrados de los conejos a 37° C. durante media hora, se removió el coagulo y se centrifugó por 5 min a 14 000 xg, se recuperó el suero con una pipeta Pasteur y se guardó a 4° C en presencia de Azida de Sodio 0.02% como preservador.

3.21 Determinación del título de anticuerpos.

El título de los anticuerpos se determinó por medio de la técnica de ELISA (del ingles Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Se sensibilizó una placa de ELISA de 96 pozos con 5 ng de antígeno/pozo (His-*EhRab8*) disuelto en buffer de carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5 por 12 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pozos 3 veces con solución de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, MgSO₄ 40 mM, Tween-20 0.05%). Los lavados se hicieron siempre después de cada reacción. Se bloquearon los pozos con 100 µl/ pozo de solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 8, gelatina 0.5%, Tween-20 0.2%) con el objeto de evitar pegados inespecíficos durante 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros 1:3 partiendo de una dilución inicial 1:30 en buffer de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, gelatina 0.1 mg/ml, Tween-20 0.05%). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, se agregó el 2o. anticuerpo IgG (H+L) Anti-conejo de cabra conjugado a peroxidasa (Zymed) utilizando una dilución 1:2500 respecto a la presentación comercial y se incubó 1 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló adicionando 50 µl de sustrato ABTS a cada pozo. Se detuvo la reacción con 25 µl de ácido fluorhídrico concentrado por pozo y se leyó la densidad óptica a 405 nm en el lector

automatico de ELISA (BIO-RAD) utilizando el programa Microplate Manager 4.0.

3.22 Purificación y caracterización de los anticuerpos policlonales.

3.22.1 Acoplamiento de HGFPCOOHRab8 a Sefarosa 4B-CNBr.

Se pesó 1 gr de sefarosa 4B-CNBr (1 gr-puede unir hasta 10 mg de proteína, 1 gr hidratado da un volumen de 3 ml), se hidrató la sefarosa 4B-CNBr con HCl 1 mM, hasta disolver los cristales de lactosa, se filtró y se lavó con el mismo buffer. En un tubo falcon se puso la sefarosa 4B-CNBr hidratada y 1 mg de proteína HGFPCOOHRab8 pura, se agitó por 1 hora en el nutator. Se centrifugó la mezcla y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280. Se calculó la eficiencia del acoplamiento restando la absorbancia del sobrenadante en mg/ml a los mg iniciales de proteína puestos a acoplar, la eficiencia fué de un 90%.

3.22.2 Acoplamiento del péptido Rab8 177-194 a Sefarosa 6B-Tiopropilo.

Se pesó 1 gr de Sefarosa 6B-Tiopropilo (1gr puede unir hasta 10 mg de proteína, 1 gr disuelto da un volumen de 3ml), se hidrató con un buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.6 / EDTA 1 mM por 15 min. Se filtró y se lavó la resina con el mismo buffer. Se pasó la resina a un tubo y se añadieron 6 mg de péptido previamente disuelto en 100 μ l de DMSO. Se agitó toda la noche y se lavó la columna con Tris-HCl 0.1 M pH 8 / β -mercaptoetanol 0.5 mM para inactivar los grupos tiopropilo que hayan quedado libres.

3.22.3 Purificación de anticuerpos.

El suero se diluyó con 2.5 ml de Tris-HCl 0.2 M pH 8 (relación 1:1). Se mezcló y se centrifugó a 14, 000 xg. Se empacó la columna (hecha en el laboratorio con una jeringa de 5 ml y un filtro) con la resina sefarosa 4B + el inmunoabsorbente. Se equilibró la columna con Tris-HCl 0.1 M pH 8. Se lavó con Tris-HCl 0.1M pH 8 / NaCl 0.5M y se eluyeron los anticuerpos con ácido acético 0.1M. Inmediatamente se neutralizaron con Tris-HCl 1 M pH 8. La cantidad de anticuerpos purificados se cuantificó leyendo la adsorbancia a 280. Se neutralizó

la columna con Tris-HCl 0.1 M pH 8. Los anticuerpos se preservaron agregando 0.1 mg/ml de BSA acetilada + 0.01% de Azida de sodio a 4 C.

3.23 Preparación de muestras y lisado amibiano.

Las muestras de proteínas a analizar se desnaturalizaron a 100° C en presencia de β -mercaptoetanol 2.5%. Para los lisados amibianos, los trofozoitos se resuspendieron en 1/4 del volumen total de buffer 5X (Composición del buffer: SB buffer 10X, E64 (inhibidor de cistein proteasas a una concentración final de 0.5 mM) y PMSF (inhibidor de serin proteasas a una concentración final de 5 mM). Las células se lisaron mecánicamente con vortex, la muestra se hirvió a 100° C, se centrifugó a 14,000 xg un par de minutos y se cargó en un gel SDS-PAGE al 15%.

3.24 “Western blot” (Inmunodetección).

La transferencia de proteínas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa, Bio-Rad) se realizó utilizando el método de transferencia semihumeda en una cámara de transferencia de geles OWL. Para la transferencia se siguió el siguiente orden: 3 papeles filtro Whatman 3 mm núm. 1, el gel a transferir, la membrana de nitrocelulosa y 3 papeles filtro Whatman 3 mm núm. 1 encima, todos ellos humedecidos en el buffer de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-Base 48 mM, SDS 0.037%, metanol 20% pH 7) para Western blot. Se transfirió por 1 hr a 400 mA a corriente constante. La nitrocelulosa se bloqueó toda la noche en 5% leche descremada en buffer TBST (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05%) con agitación a temperatura ambiente. Se lavó la membrana 3 veces con TBST/10 min después de cada reacción. Se incubó con el primer anticuerpo (1 μ g/ml de anti His-*EhRab8*) en 10 ml de TBST + 0.1% leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubó con el segundo anticuerpo Ap-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Zymed) utilizado a una dilución 1:2500 respecto a la presentación comercial en TBST + 0.1% leche descremada durante 1 hr a temperatura ambiente. Se reveló la membrana con 10 ml de buffer NBT/BCIP (Zymed), 1 ml de cada uno en 8 ml de H₂O, la reacción se detuvo con 5 mM EDTA.

3.25 Fijar células con P-formaldehído 4%

Para la citolocalización de la proteína *EhRab8* se utilizaron 2 tubos de amibas en fase logarítmica. En placas de cultivo de 6 pozos se colocó un cubreobjetos por pozo y se agregaron 2 ml del cultivo amibiano a cada pozo. Se selló la caja de cultivo con parafilm y se incubó a 37° C por 1 h en la cámara anaeróbica (Forma Scientific, Inc. modelo 1025). Se prepararon 100 ml de una solución de paraformaldehído al 4% (para disolver se le agregaron 100 µl de NaOH 1N y se calentó a 60° C. Se dejó enfriar y se añadieron 50 ml de PBS 2X + 0.02M lisina). Se removieron los 2 ml de suero BI-S y se lavó 1 vez con 1 ml de PBS 1X a 37° C. Se agregó 1 ml de paraformaldehído 4% y se incubó por 10 min. Para permeabilizar las células se removió el paraformaldehído y se lavó 3 veces con PBS 1X + 0.05% TRITON X-100 por 10 min cada uno. Los lavados se hicieron después de cada reacción. Se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% utilizando 1 ml por pozo durante 1 h. Se removió la leche y se lavó 1 vez con 1 ml de PBS 1X 10 min. Para la tinción de núcleo (con PI) se trataron las células fijadas con RNasa a una concentración de 150 µg/ml en PBS 1X 20 min. a 37° C, se usó 1 ml por pozo. Se preparó una dilución de 1er anticuerpo en leche descremada (5 µg/ml) y se pusieron 500 µl de la dilución a cada pozo, se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se preparó una dilución 1:1000 de 2o. anticuerpo Alexa 488, se adicionó 1 ml por pozo y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se preparó una dilución 1:1000 del stock de PI en PBS 1X. Se utilizó a una concentración final de 2 µg/ml. Se puso 1 ml por pozo. Se dejó por 10 min. Se removió. Se levantaron los cubreobjetos con la ayuda de pinzas finas y se colocaron sobre un portaobjetos con la cara que contiene a las amibas hacia abajo. Se selló con barniz.

IV RESULTADOS

4.1 Obtención de la secuencia completa del gene *Ehrab8*.

4.1.1 Tamizado de un banco genómico de *E. histolytica*.

Para obtener la secuencia del gene *Ehrab8*, se realizó un tamizado del banco genómico λ ZAPII de *Entamoeba histolytica* [Pérez-Monfort and Saavedra-Lira, 1994]. Como sonda para el tamizado se utilizó un fragmento de 203 pb del gene *Ehrab8*, reportado como un EST (Expressed Sequence Tags) por Azam y colaboradores (1996). El fragmento utilizado como sonda se amplificó en el laboratorio utilizando los oligonucleótidos Rab 8.1 y Rab 8.2 (ver secuencias en Materiales y Metodos), como templado de la reacción se utilizó ADN genómico de *E. histolytica*. Se obtuvieron 11 clonas positivas las cuales fueron escindidas *in vivo* para dar lugar a plásmidos tipo pBSSK(-) que contuvieran el inserto genómico flanqueado por sitios de restricción *EcoRI*. Las clonas escindidas fueron analizadas por PCR utilizando los oligonucleótidos Rab 8.1 y Rab 8.2. De las 11 clonas analizadas únicamente 5 de ellas (clonas 8.1.15, 8.1.2, 8.1.3, 11.3.3, 11.3.5) amplificaron el fragmento conocido de 203 pb por lo que en los siguientes análisis se procedió a caracterizar estas 5 clonas con más detalle. Cinco de las clonas restantes (clonas 10.2.1, 10.2.2, 11.3.1, 11.3.2, 11.3.4) fueron digeridas con *EcoRI* y liberaron insertos entre 3 y 4 Kb. Estas clonas fueron secuenciadas parcialmente con los oligos T7 y T3. El análisis por BLAST (del servidor NCBI vía internet) de las 5 clonas mostró que las secuencias no presentan homología con genes tipo *rab8*. Estas clonas no fueron completamente caracterizadas, nos enfocamos a aquellas que amplificaban el fragmento conocido de 203 pb.

4.1.2 Análisis del patrón de restricción de las clonas que amplifican el fragmento de 203 pb.

Para caracterizar el inserto contenido en las 5 clonas positivas, se realizó un análisis del patrón de restricción que consistió en dos partes: en primer lugar las clonas se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el inserto y conocer su tamaño. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos; tres de las clonas (8.1.15, 8.1.2 y 8.1.3) liberaron un inserto de aprox. 5 Kb, las otras dos clonas (11.3.3 y 11.3.5) sólo se linearizaron. Para liberar el inserto de las clonas

11.3.3 y 11.3.5 se realizó una digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III ya que los sitios de restricción respectivos se encuentran flanqueando el sitio *Eco*RI. En la Figura 6 se muestran los resultados, en los que se aprecia que las clonas liberaron un inserto de aprox. 4 Kb. Al parecer estas clonas perdieron un sitio *Eco*RI probablemente durante la escisión del fagémido.

La siguiente parte del análisis del patrón de restricción consistió en digerir las clonas utilizando diferentes enzimas de restricción con el objeto de encontrar una enzima que digiriera al inserto en varios fragmentos favoreciendo el análisis por subclonación y la secuenciación. Se eligieron enzimas de restricción que cortan en secuencias ricas en A/T ya que el genoma de la amiba es rico en estos nucleótidos. Las enzimas utilizadas fueron: *Bam*HI, *Hind*III, *Acc*I, *Cla*I, *Eco*RV, *Hpa*I, *Dra*I, *Xho*I, *Xba*I, *Pst*I, *Bcl*II, *Bgl*II y *Ssp*I. De estas enzimas únicamente *Eco*RV, *Bgl*II y *Ssp*I cortaron el inserto. Se eligió trabajar con *Ssp*I ya que con esta enzima se obtuvo el mayor número de bandas. En la Figura 7, se muestra la digestión de las clonas con la enzima *Ssp*I: las clonas 8.1.15 y 8.1.2 presentan el mismo patrón de restricción, mientras que las clonas 11.3.3 y 11.3.5 son iguales entre sí y la clona 8.1.3 se digirió parcialmente. Para identificar cuales de los fragmentos de restricción *Ssp*I corresponden a la secuencia del gene *Ehrab8* se realizó un Southern blot; los resultados se describen en el siguiente inciso.

4.1.3 Análisis por Southern blot de las clonas.

Se realizó un Southern blot de las 5 clonas digeridas con las enzima *Ssp*I para identificar cuales de los fragmentos de restricción hibridaban con la sonda específica de *Ehrab8* utilizada en el tamizado. La subclonación de estos fragmentos facilitaría la estrategia de secuenciación de las clonas.

En la Figura 7, se muestran los resultados del análisis de las clonas por Southern blot. La sonda hibridó con 2 fragmentos de aproximadamente 900 pb y 150 pb, respectivamente. Estos fragmentos son comunes a todas las clonas por lo que concluimos que, a pesar de que existen diferencias en el tamaño del inserto, los fragmentos correspondientes a la secuencia de *Ehrab8* son los mismos en cada

Liberación del inserto

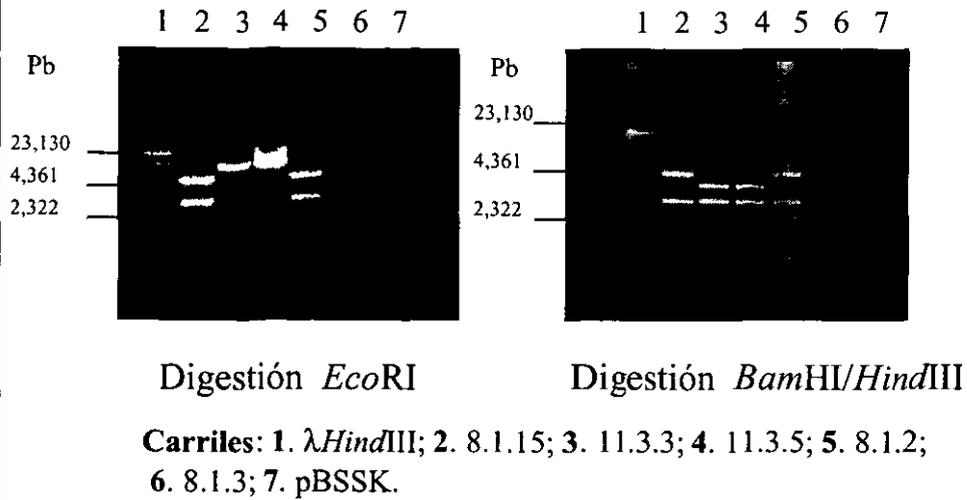


Figura 6. Se ilustra la liberación del inserto contenido en las 5 clonas positivas que amplificaron el fragmento conocido de 203 pb. Las clonas 8.1.15, 8.1.2 y 8.1.3 liberan el inserto al digerirse con *EcoRI*, las clonas 11.3.3 y 11.3.5 liberan el inserto con la digestión doble *BamHI/HindIII*.

Southern blot de las clonas positivas

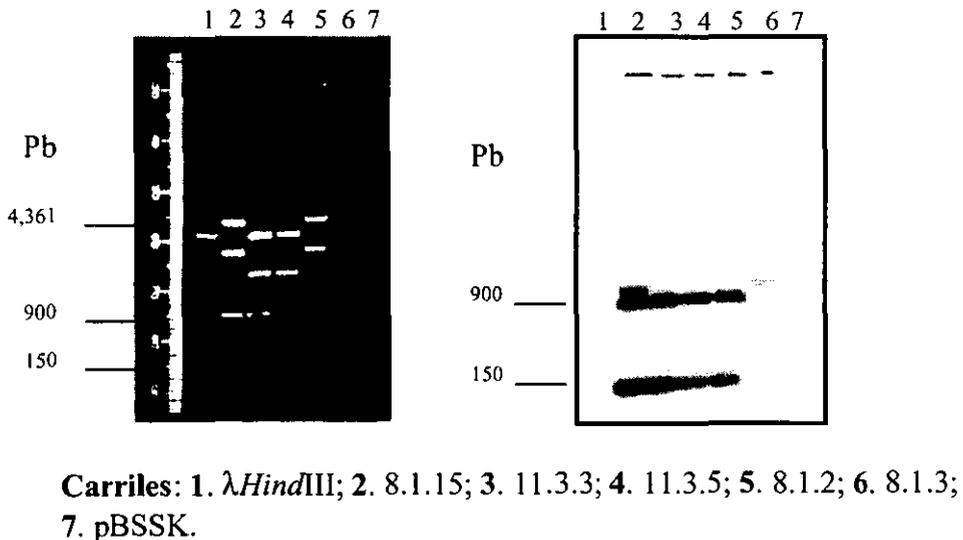


Figura 7. El gel de la izquierda muestra las clonas positivas digeridas con la enzima *SspI* y teñidas con bromuro de etidio, el gel de la derecha muestra el Southern Blot de las clonas. Como sonda se utilizó el fragmento conocido de *Ehab8*.

clona, por lo que para los siguientes estudios utilizamos únicamente a la clona 8.1.15.

4.1.4 Secuenciación de la clona 8.1.15.

La clona 8.1.15 fue secuenciada con los oligonucleótidos universales T3 y T7 específicos para el plásmido pBSSK y el oligonucleótido Rab 8.2 específico del gene *Ehrab8*. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando los siguientes programas: BLAST del servidor NCBI vía internet y GeneWorks versión 2.5.1 (IntelliGenetics, Inc.). En la Figura 8 se muestra la estrategia de secuenciación utilizada. El alineamiento de la secuencias obtenidas con los oligonucleótidos 8.2 y T7 frente a la secuencia del fragmento amplificado por PCR y la reportada como EST confirmó la presencia de secuencia *Ehrab8* en la clona 8.1.15 e indicó la orientación del gene *Ehrab8* respecto a la clona. Por otro lado, el análisis de la secuencia del gene *Ehrab8* en esta clona mostró que el gene se encontraba truncado en su extremo 3' debido a la presencia de un sitio de restricción *EcoRI*. El fragmento de 900 pb identificado en el análisis por Southern blot fue subclonado en el vector pBSSK y secuenciado con los oligonucleótidos T3 y T7, de esta forma se verificó el 5' del gene *Ehrab8* contenido en este fragmento.

El análisis por BLAST de la secuencia de la clona 8.1.15 obtenida con el oligonucleótido T3 mostró que en el otro extremo del inserto de 5 Kb de la clona se encuentra la secuencia con marco de lectura abierta que codifica para una posible ValyltRNA sintetasa. En la Figura 9 se muestra la posible organización de los genes dentro de la clona 8.1.15.

La secuencia del extremo 3' del gene *Ehrab8* se obtuvo mediante la técnica de 3' RACE (del inglés Rapid Amplification of cDNA Ends). Se amplificó el 3' del gene utilizando como templado cDNA de amiba sintetizado a partir de RNA Poli (A+) usando los oligonucleótidos sentido Rab 8.1 y antisentido AUAP-B (ver Materiales). Se realizó una reamplificación ("*nested-PCR*") utilizando como templado el producto de la primera reacción, el oligonucleótido AUAP-B y un oligonucleótido interno superpuesto al primero Rab 8.3 (ver Materiales y Métodos).

Estrategia de secuenciación del gene *Ehrab8*

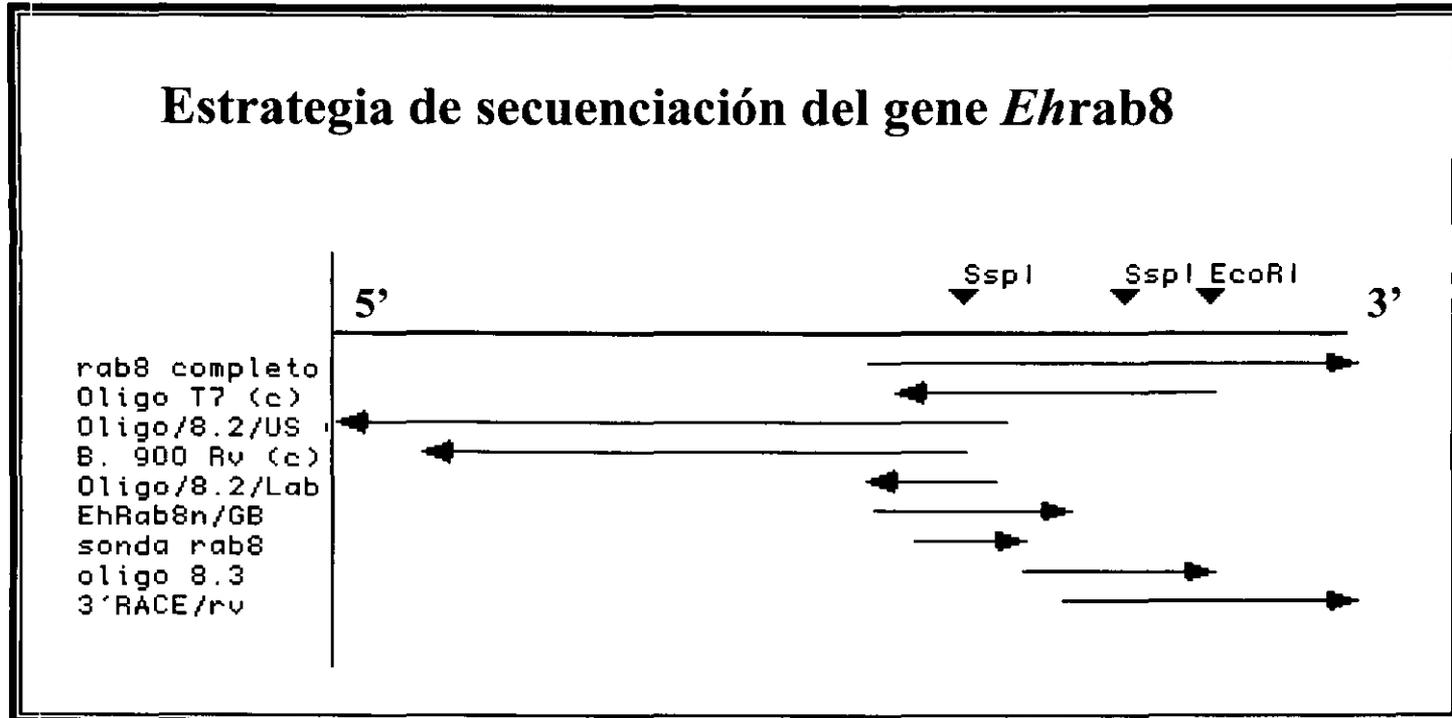


Figura 8. La secuencia del gene *Ehrab8* de 5' a 3' esta representada por la primera flecha. Los sitios de restricción *SspI* y *EcoRI* se encuentran ubicados. Las flechas restantes representan la estrategia de secuenciación del gene *Ehrab8* utilizando diferentes oligonucleótidos (T7, Rab 8.2, Rab 8.3) y la ubicación de la sonda utilizada en el tamizado. Algunas regiones fueron secuenciadas más de una vez.

Organización del gene *Ehrab8* dentro de la clona 8.1.15.

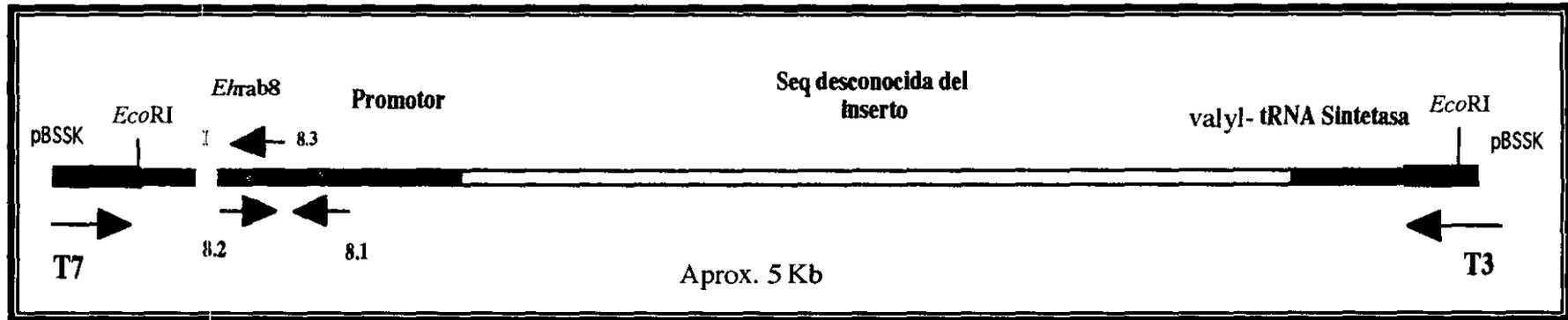


Figura 9. El tamaño del inserto representado linealmente en colores es de aprox. 5 Kb. El gene *Ehrab8* se representa en rojo, el intrón en amarillo y las secuencias promotoras en verde. La ubicación de algunos oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se representa en flechas azules. En rosa se representa la ubicación de un fragmento del gene Valyl-tRNA sintetasa.

Como producto de la reacción se obtuvo un fragmento de aprox. 460 pb, el cual se clonó en el sitio de restricción *SmaI* en el vector pBSSK. 9 de 10 clonas analizadas por restricción con las enzimas *BamHI* y *HindIII* liberaron un fragmento de aprox. 460 pb (ver Figura 10), cuya identidad fue determinada por análisis de secuencia. Las 9 clonas contenían el mismo fragmento. La secuencia obtenida se empalmó alineándola con la secuencia de la clona genómica utilizando el programa de GeneWorks. La Figura 11 muestra la secuencia completa del gene *Ehrab8*.

El marco abierto de lectura del gene *Ehrab8* es de 658 pb y predice una proteína de 200 aa con un peso molecular teórico de 22,272 Daltons. La secuencia genómica de *Ehrab8* se encuentra interrumpida por un intrón de 58 pb que disrumpe el marco abierto de lectura en el nucleótido 289. El intrón fue identificado por la presencia de secuencias conservadas aceptoras y donadoras de "splicing" (GT y AG) en el gene *Ehrab8*. Se realizó el análisis del uso de codones de *Ehrab8* utilizando el programa Codon Preference del paquete GCG. En la Figura 12 se muestran los resultados de este análisis. El gene *Ehrab8* tiene un uso preferencial de codones de *E. histolytica* conservado en el primer marco de lectura según el análisis. Igualmente, el análisis de la composición nucleotídica del gene *Ehrab8* indica que la región codificante del gene es rica en los nucleótidos A y T, por arriba de un 70%, característica observada en los genes amibianos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

NUCLEOTIDO	CANTIDAD	PORCENTAJE
A	247	38
C	77	12
G	125	18
T	209	32
C + G	202	30
A + T	456	70

Tabla 3. Composición nucleotídica del gene *Ehrab8*.

Liberación del inserto de las clonas 3' RACE

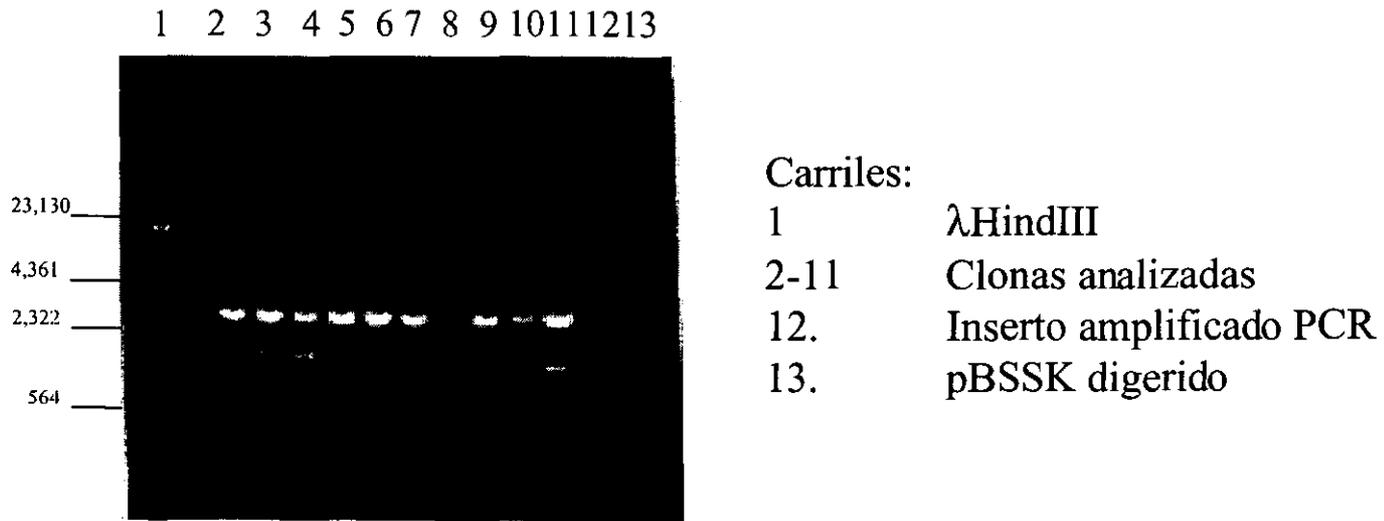


Figura 10. Análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III de las clonas obtenidas por 3' RACE.

Rab8 de *Entamoeba histolytica*

```

GATGGACCAG AAGAAGAAAA AATTTTAGAA AAGAACATCC AAGAAGCAAG GGTATTAAT GAAAAAATC GAGCAGCTAA ATCACCTGTT      90
ATTGTGATTG ATGTTGATGA GCCAAAACCT TAGTTATTTA TAAATAAATT TATTGAGCG TCAATGGTTA TGAATAATTG CATTATTA   180
ATTATGAAAG AAAAATTATA TGAATAAAAA ATGAAATTAG AGTTACATAA AATTTACTT CTTTTATGAA AAATTTGTTA TTAATTATA   270
TATAATTATA GTTTAATATA AAAAAAAG AAAGAAAAA CTAATTAATA AAAAAACAA ATGTCGGAGA AGGATTCAAC AATTAAC   360
TTACTCATTG GAGAAAGTGG AGTTGGGAAA AGTTCACTTT TACTTAGATT TTCTGAAGAT GCTTTCAACC CAATGTACAT TACGACTGTA  450
L L I G E S G V G K S S L L L R F S E D A F N P M Y I T T V
GGTATTGATT TCAGAGTTAA AAATATTGAG TTAGATAATA AGAAATTA   A GTTACAAATA TGGGATACGG CTGGACAAGA ACGATTTAGA   540
G I D F R V K N I E L D N K K L K L Q I W D T A G Q E R F R
ACTATTGTAT CAAGTTATTA TAGAGGAGTT ATGGGAATTG TTTTAGTATA TGATATTACT TCAAGAGAGT CTTTTAACAg tttgttttaa  630
T I V S S Y Y R G V M G I V L V Y D I T S R E S F N S
tattttaatt aaaaatgogat atgtatgaaa tgatgttttaa tgattagACA TTGAATATTG GATGAGAAAC ATTGAAGCTA ATGCAGACCA   720
I E Y W M R N I E A N A D Q
AAATGTTAAT AAAATTCTTG TTGGAAATAA GTGTGATGCT GAAGATAAAA GAGTTGTTAC AAGTGAAGAA GGACAACAAA TGGCTAATAA   810
N V N K I L V G N K C D A E D K R V V T S E E G Q Q M A N K
ATTAGGAATT CCATTCCTAG AAACATCTGC CAAAATTCA TAAAAGTTG ATGACTGTTT TATTCATTA GCACGTGATG TTATTCAAAG   900
L G I P F L E T S A K N S L K V D D C F I S L A R D V I Q R
AATTGGTGAA TCATCTCAA GTGCACAACC AGGAATTGTT GACCCAACCC AACAAACCCA ACCAACTGAA TCAACTGGAT GTTGTTAATC   990
I G E S S Q S A Q P G I V D P T Q Q T Q P T E S T G C C .
ACATTCCTT CTCTTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA |                                     1030
  
```

Figura 11. Secuencia completa del gene *Ehrab8*. En azul se muestra la secuencia codificante, en rojo el intrón de 58 pb, los recuadros marcan la caja CAT, dos cajas TATA y la señal de poliadenilación putativas. El inicio de la transcripción se indica con una flecha. En negro se marca la secuencia en aminoácidos.

CODONPREFERENCE of: rab8 Ck: 6573, 1 to 608 June 10, 1999 16:55
Codon Table: codonusage.cod PrefWindow: 25 Rare Codon Threshold: 0.10
BiasWindow: 25 Density: 19.9

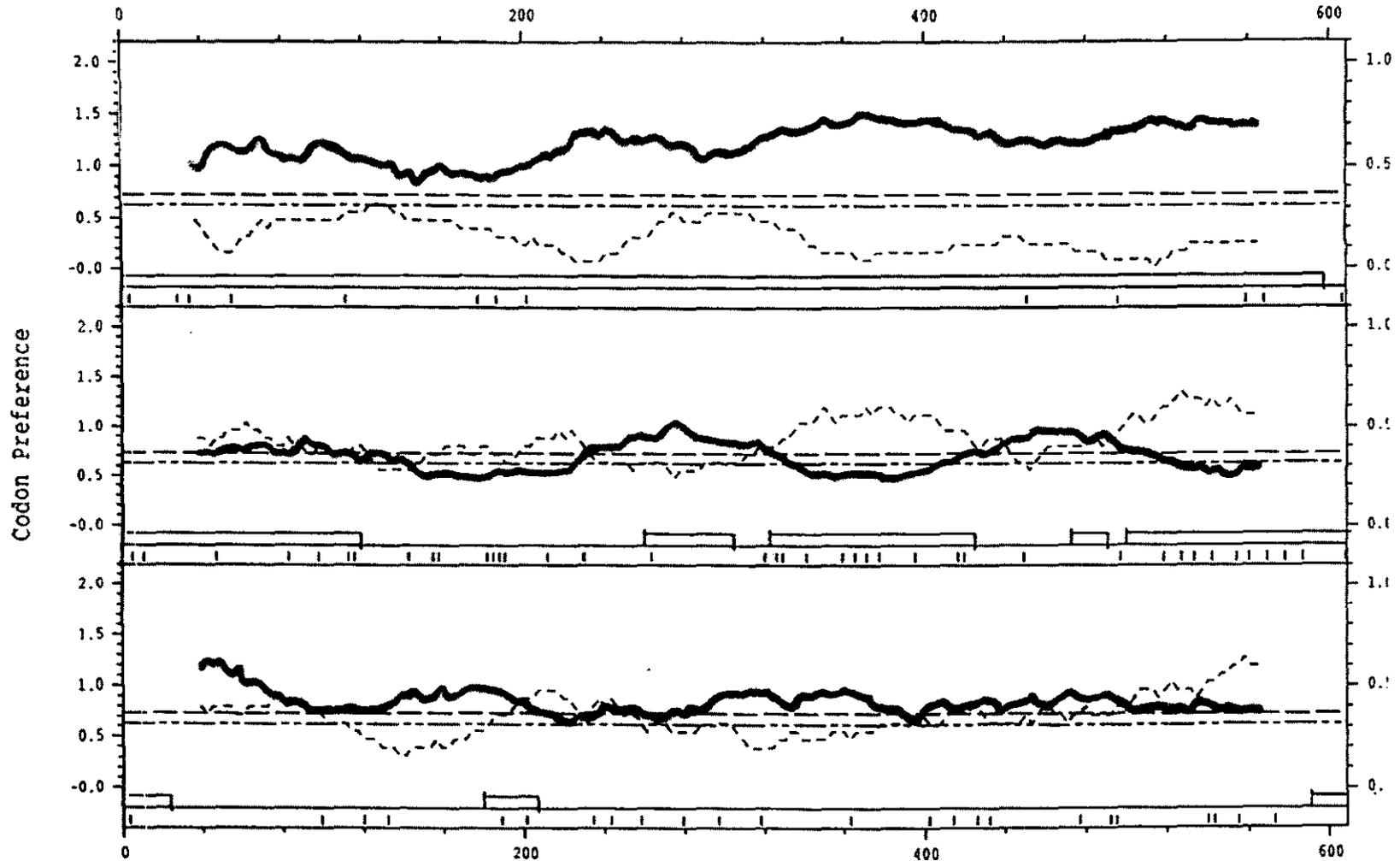


Figura 12. La línea continua representa el uso de codones del gene *Ehrab8*. La figura muestra 3 marcos de lectura. *Ehrab8* conserva el uso preferencial de codones de *E. histolytica* en el primer marco de lectura. La línea punteada representa el desvío de la tercera base según el % de GC.

4.2 Identificación del inicio de la transcripción.

Como parte de la caracterización de la secuencia del gene *Ehrab8*, se identificó el sitio de inicio de la transcripción utilizando la técnica de 5' RACE. Como templado para la amplificación se utilizó cDNA de amiba generado a partir de RNA poli (A+) modificado por la adición de una etiqueta de G's en el extremo 5'. Los oligonucleótido (sentido) oligo dC y (antisentido) Rab 8.5 (ver Materiales y Métodos) fueron utilizados en una primera reacción de PCR.. Se realizó una segunda amplificación ("nested-PCR") utilizando como templado el producto de la reacción anterior, los oligonucleótidos oligo dC y Rab 8.2 (ver Materiales y Métodos) . El producto obtenido se clonó en el vector pBSSK (-) digerido con *SmaI* y las clonas positivas aisladas fueron secuenciadas utilizando el oligonucleótido Rab 8.2. El inicio de la transcripción del gene *Ehrab8* se encontró a 11 pb corriente arriba del inicio de la traducción (ATG); la secuencia inicio de la transcripción es AAAA, (donde A indica el nucleótido de inicio). La secuencia encontrada difiere de las secuencias consenso ATCA/ATTCA reportadas para otros genes de amiba [Bruchhaus et al, 1993].

Se realizaron alineamientos de la secuencia obtenida por 5' RACE con la secuencia genómica y los resultados los podemos ver en la Figura 13. Los alineamientos muestran la presencia de un residuo G extra en la secuencia 5' RACE, ubicado corriente arriba de la primera A del sitio de inicio de la transcripción, este residuo no se encuentra en la secuencia genómica. En eucariotes una de las modificaciones post-traduccionales que sufre el RNA mensajero para su maduración es la modificación química de su extremo 5' por la adición del nucleótido modificado 7-metilguanósina (7mG) por una guaniltransferasa. A esta modificación se le llama "cap" y se piensa que es el sitio de reconocimiento para que el RNA mensajero se una al ribosoma, migre hasta el codon de inicio ATG e inicie la traducción [Smith y Wood, 1998]. La presencia de este residuo en la secuencia del cDNA de *Ehrab8* sugiere que su RNA mensajero sufre un proceso de maduración por "Capping".

En la secuencia 5' no codificante del gene *Ehrab8*, identificamos 2 cajas TATA putativas TATAATTA y TATTAATT ubicadas en la posición -60 a -51 y -72 a -63, respectivamente, las cuales fueron localizadas por homología con la

Alineamiento del 5' RACE de *Ehrab8*

		
EhRab8	CTAATTATA AAAAAACAA ATGTCGGAGA AGGATTCAAC AATTAACATA TTA CTCTATTG	120
Clona9 5'RACE	CCCCCCCCG AAAAAACAA ATGTCGGAGA AGGATTCAAC AATTAACATA TTA CTCTATTG	67
Clona7 5'RACE	CCCCCCCCG AAAAAACAA ATGTCGGAGA AGGATTCAAC AATTAACATA TTA CTCTATTG	67
	●	
EhRab8	GAGAAAGTGG AGTTGGGAA AGTTCACCTT TACTTAGATT TTCTGAGAT GCTTTCACCC	180
Clona9 5'RACE	GAGAAAGTGG AGTTGGGAA AGTTCACCTT TACTTAGATT TTCTGAGAT GCTTTCACCC	127
Clona7 5'RACE	GAGAAAGTGG AGTTGGGAA AGTTCACCTT TACTTAGATT TTCTGAGAT GCTTTCACCC	127
EhRab8	CAATGTACAT TACGACTGTA GGTATTGATT TCAGAGTTAA AATATTGAG TTAGATAATA	240
Clona9 5'RACE	CAATGTACAT TACGACTGTA GGTATTGATT TCAGAGTTAA AATATTGAG TTAGATAATA	187
Clona7 5'RACE	CAATGTACAT TACGACTGTA GGTATTGATT TCAGAGTTAA AATATTGAG TTAGATAATA	187
EhRab8	AGAAATTAAT GTTACAAATA TGGGATACGG CTGGACAGA ACGATTTAGA ACTATTGTAT	300
Clona9 5'RACE	AGAAATTAAT GTTACAAA-----	205
Clona7 5'RACE	AGAAATTAAT GTTACAAA-----	205

Figura 13. La primera línea corresponde a un fragmento de la secuencia genómica del gene *Ehrab8*, la segunda y tercera línea corresponden a la secuencia de 2 clonas obtenidas por 5' RACE. La flecha indica el inicio de la transcripción. Nótese el residuo G extra (marcado con un punto negro) presente en las clonas de 5' RACE pero ausente en la secuencia genómica.

caja tipo TATA consenso TATTTAAA reportada en amiba [Bruchhaus et al, 1993]. De igual manera, la señal consenso de poliadenilación CATT reportada para otros genes de amiba [Bruchhaus et al, 1993] fue identificada en la posición +605 a +609 del gene *Ehrab8*. En la Figura 11 se muestran los elementos regulatorios encontrados.

4.3 Secuencia polipeptídica de *EhRab8* deducida y homología.

El marco abierto de lectura del gene *Ehrab8* es de 600 pb y predice una proteína de 200 aa con un peso molecular teórico de 22, 272 daltons. El análisis por BLAST (versión Blastp 2.1.2 del NCBI) de la secuencia polipeptídica mostró que *EhRab8* guarda un alto porcentaje de identidad con proteínas tipo Rab8 de otros organismos, la Tabla 4 resume estos datos.

Se realizaron alineamientos de la proteína *EhRab8* con sus homólogos en otros organismos. En la Figura 14 se muestra el alineamiento entre proteínas tipo Rab8 y *EhRab8*.

Organismo	Identidad	Similitud
	%	%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	63	83
<i>Saccharomyces pombe</i>	62	83
<i>Dictyostelium discoideum</i>	61	79
<i>Drosophila melanogaster</i>	58	77
<i>Rattus norvegicus</i>	54	73
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47	70

Tabla 4. Porcentaje de identidad y similitud entre la proteína *EhRab8* y sus homólogos de diferentes organismos. Análisis realizado con el programa BLAST 2 sequences versión Blastp 2.1.2 del NCBI).

Como parte de la caracterización de la secuencia de *EhRab8*, se realizó un análisis comparativo de los motivos de unión a GTP identificados en *EhRab8* y los motivos consenso conservados entre las GTPasas. De igual forma, se identificaron en la secuencia de *EhRab8* los motivos que caracterizan a las proteínas Rab según

el trabajo de Pereira-Leal and Seabra, 2000. La tabla 5 muestra el análisis realizado. Los motivos de unión G-2, G-3 y G-4 de *EhRab8* son altamente conservados con respecto a los consensos reportados. El motivo G-1, el más variable de todos, presenta los aminoácidos GKS conservados. En el dominio efector característico para proteínas Rab TIG(I/V/A)(D/E)F(K/G/L) involucrado en la interacción con moléculas efectoras también se identificó en *EhRab8* (TVGIDFR), pero en lugar del residuo conservado isoleucina tiene una valina y la última lisina, glicina o leucina descrita para el consenso aparece en *EhRab8* como arginina. Los motivos RabFs son exclusivos de las proteínas Rab y por lo tanto pueden diferenciar a las Rab de otras GTPasas. *EhRab8* presenta los motivos RabF2, RabF3, RabF4 y RabF5 altamente conservados. El motivo RabF1 se encuentra menos conservado. Por lo anterior podemos asegurar que la proteína *EhRab8* es un auténtico miembro de la familia de las proteínas Rab.

Motivos de unión a GTP consenso	Motivos de unión a GTP de <i>EhRab8</i>	Motivos RabF de proteínas Rab	Motivos RabF de <i>EhRab8</i>
G-1 GXXXXGKS/T	G-1 GESGVGKS	RabF1 IGVDF	RabF1 VGIDF
G-2 LDTAGQE	G-2 WDTAGQE	RabF2 KLQPW	RabF2 KLQIW
G-3 VGNKCD	G-3 VGNKCD	RabF3 RFRSIT	RabF3 RFRTI
G-4 IETSAK	G-4 LETSAK	RabF4 YYRGA	RabF4 YYRGV
		RabF5 LVYDIT	RabF5 LYYDIT

Tabla 5. Comparación de motivos de unión a GTP y de motivos RabF consenso con los motivos encontrados en *EhRab8*.

4.4 “Southern blot”.

Para conocer el número de copias del gene *Ehrab8* presentes en el genoma de *E. histolytica*, utilizamos la técnica de “Southern blot”. Se digirió DNA genómico de amiba con las enzimas de restricción *EcoRI*, *AccI* y *SpeI*. Después de transferir el DNA a la membrana se hibridó con un fragmento de 150 pb correspondiente al extremo 3’ de la secuencia codificante de *Ehrab8* (ubicada corriente abajo del sitio de restricción *EcoRI* identificado en el gene). Esta región es específica del gene *Ehrab8* ya que codifica para una región poco conservada entre las proteínas Rab. Como controles del experimento en el gel se incluyó un carril con DNA genómico sin digerir y uno con el fragmento utilizado como sonda. En la Figura 15 se muestran los resultados del “Southern blot”. La sonda

hibrida con sólo un fragmento producto de la digestión con *EcoRI* aproximadamente de 20 600 pb, lo cual sugiere que *Ehrab8* se encuentra presente como única copia en el genoma de la amiba. Este resultado fue confirmado por las digestiones con las enzimas de restricción *AccI* y *SpeI*, donde se observó que la sonda hibrida con sólo un fragmento de restricción producido por cada enzima. Cabe mencionar que el gen *Ehrab8* no contiene sitios de restricción para esas enzimas.

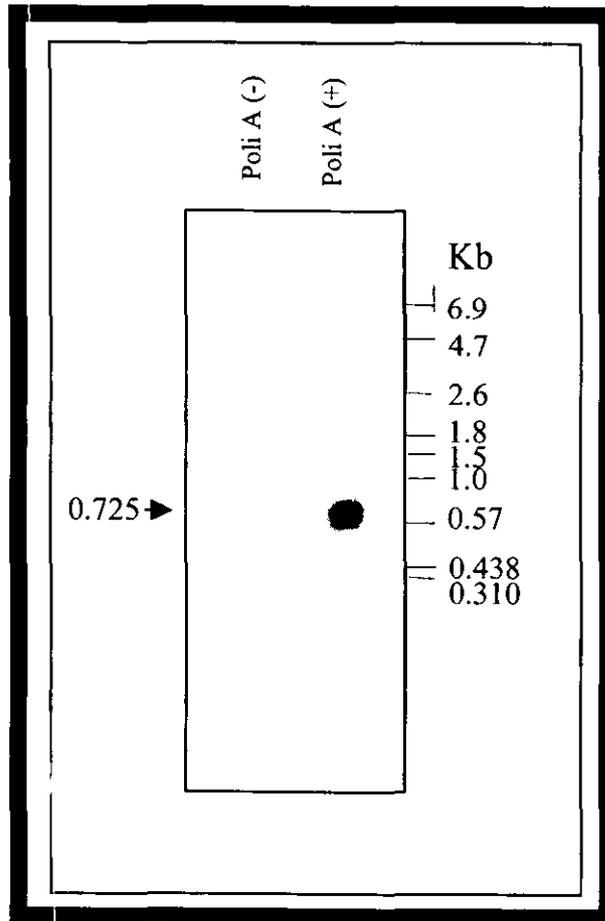
4.5 “Northern blot”.

Para analizar la expresión y el tamaño del transcrito del gene *Ehrab8*, se utilizó la técnica de “Northern blot”. Para el experimento se utilizó RNA poliA (+) y RNA poliA (-) de amiba y la misma sonda que en el experimento de Southern blot. Los resultados del Northern blot del gene *Ehrab8* se muestran en la Figura 15. En el carril correspondiente al RNA poliA (+) se observó que la sonda hibrida con una sola banda lo que indicó que *Ehrab8* se expresa como un transcrito único de 725 bases, aproximadamente.

4.6 Expresión de la proteína recombinante His-*EhRab8*.

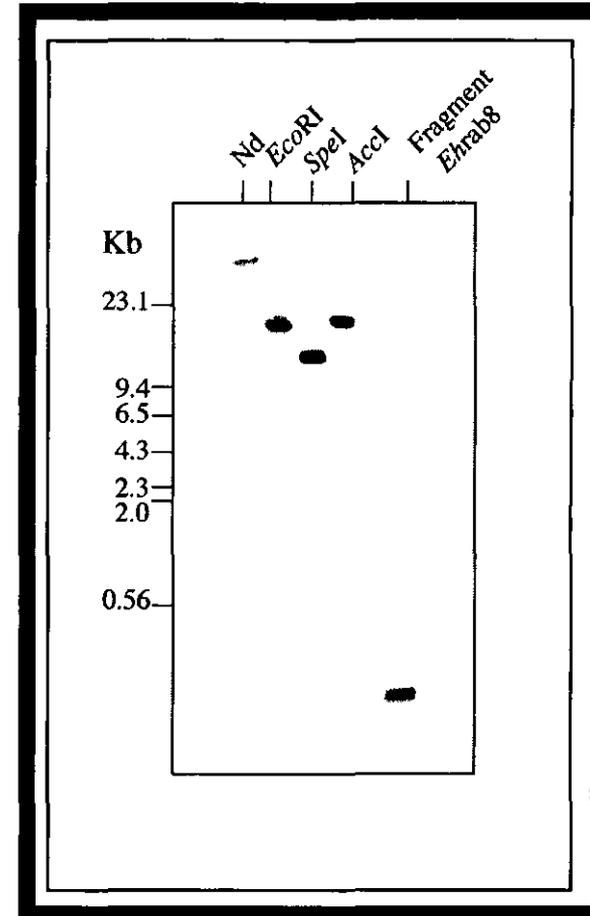
La proteína *EhRab8* se expresó en *E.coli* como proteína recombinante con una etiqueta de 6 His en el extremo amino terminal, la etiqueta está contenida en el vector de expresión pQE30; esta etiqueta facilita la purificación y la detección de la proteína recombinante. La secuencia del gene *Ehrab8* se amplificó a partir de cDNA específico utilizando los oligonucleótidos ATG Rab 8.4 y Stop Rab 8.5 (ver Materiales y Métodos) que incorporan a la secuencia los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII*, respectivamente. El producto obtenido se clonó en el vector de expresión pQE30 (QIAGEN) en los sitios de restricción correspondientes. De esta manera realizamos una fusión traduccional entre la secuencia de pQE30 que codifica para un péptido con histidinas en el carboxilo terminal y la secuencia codificante de *EhRab8*. La clona obtenida fué secuenciada para verificar que la construcción se encontrara en fase y que no se hubieran introducido cambios en la secuencia durante la amplificación. En la Figura 16 se muestra un esquema de la construcción His-*EhRab8*.

Northern blot



A

Southern blot



B

Figura 15. Northern y Southern blot de *Ehrab8*. A. Northern blot, el gene se expresa como un transcrito de aprox. 0.725 Kb. B. Southern blot, muestra que *Ehrab8* se encuentra como única copia en el genoma de *E. histolytica*. Como sonda en ambos casos se utilizaron las últimas 150 pb del gene *Ehrab8*.

Para la expresión de la proteína recombinante His-*EhRab8*, la construcción pQE30-*EhRab8* se transformó en la cepa XL1 BLUE de *E. coli* y se cultivó en presencia de IPTG 1 mM durante 2 horas. Las células cultivadas fueron lisadas por sonicación y se analizaron muestras del lisado total de proteínas en un gel de proteínas SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. En la Figura 17 A se muestra el análisis de la expresión de la proteína His-*EhRab8* de la clona pQE30-6. Se analizaron los lisados totales de la clonas con y sin inducción con IPTG. Los resultados muestran que la clona analizada expresa una proteína de aproximadamente 24 kDa correspondiente al tamaño esperado de la proteína recombinante His-*EhRab8*.

4.7 Determinación de la solubilidad de la proteína.

Para determinar la solubilidad de la proteína His-*EhRab8*, se tomaron células de *E. coli* transformadas con la construcción pQE30-*EhRab8* e inducidas con IPTG 1 mM, se lisaron por sonicación y se hizo la separación de las fracciones por centrifugación. El sobrenadante corresponde a la fracción soluble mientras que la pastilla corresponde a la fracción insoluble. Ambas fracciones fueron analizadas en un gel de SDS-PAGE al 15% y teñidos con azul de Coomassie. En la Figura 17 B se presentan los resultados de la determinación de la solubilidad de His-*EhRab8* de la clona pQE30-6. Los resultados muestran que la proteína His-*EhRab8* se expresa mayoritariamente en la fracción soluble.

4.8 Purificación de la proteína His-*EhRab8*.

La purificación de la proteína se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en una matriz agarosa-Ni-NTA (níquel-ácido nitriloacético) que presenta afinidad por moléculas etiquetadas con residuos histidina consecutivos lo que facilita su purificación. La proteína recombinante His-*EhRab8* queda unida al Ni-NTA de la resina para posteriormente ser eluída con una solución que contiene imidazol que compite con las histidinas por la unión a níquel. Para la purificación se incubó la fracción soluble con 1 ml de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) por 1 h y se empacó la mezcla en una columna. Las fracciones de lavado y elución se analizaron en un gel de SDS-PAGE al 15% y se tiñeron con azul de Coomassie. La Figura 17 C muestra los resultados obtenidos de la purificación de His-*EhRab8* de la clona pQE30-6. La proteína His-*EhRab8* purificada se observa como una banda intensa

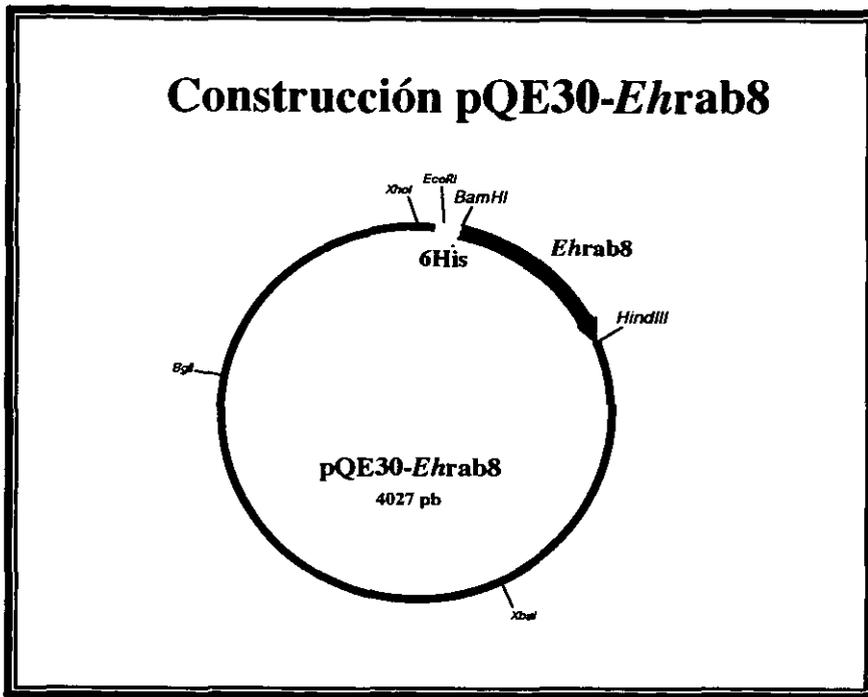


Figura 16. La región codificante de *Ehrab8* se representa en morado fusionado en el amino terminal a una etiqueta de 6 His representada en amarillo. En la Figura se marcan los sitios de clonación en el vector de expresión pQE30.

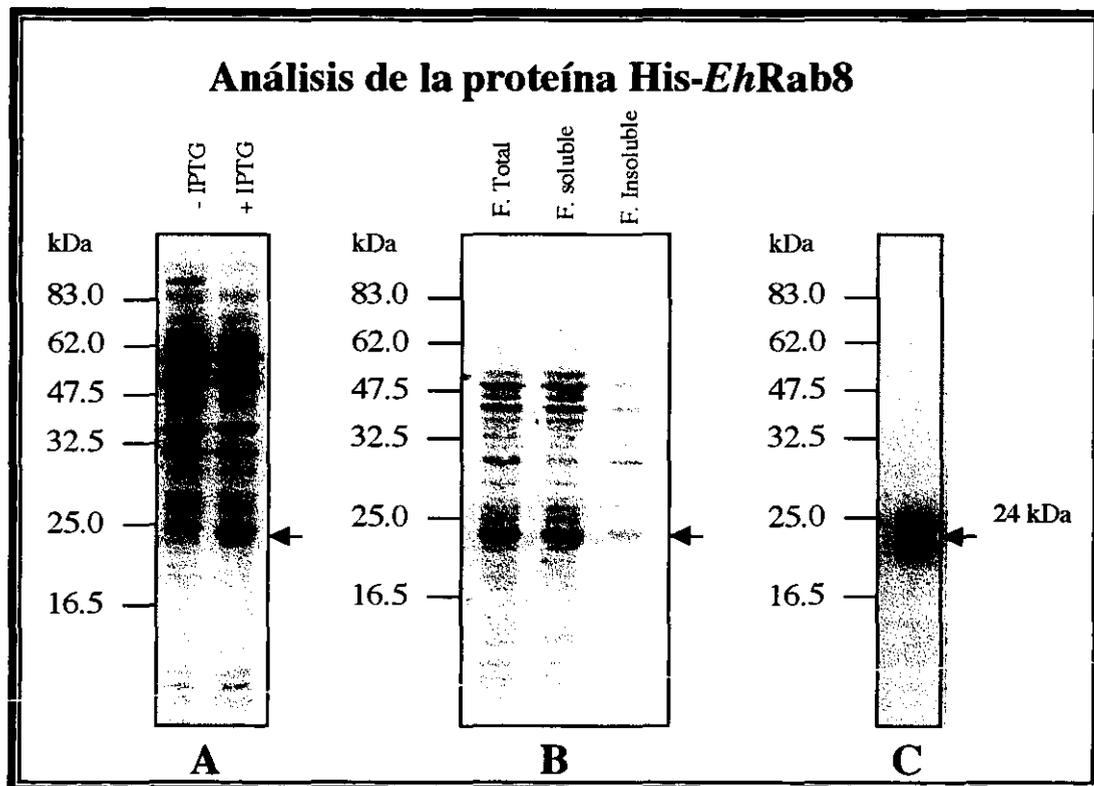


Figura 17. A. Expresión de la proteína His-*EhRab8*. B. Análisis de solubilidad de His-*EhRab8*. C. Proteína His-*EhRab8* purificada.

de aproximadamente 24 kDa. A partir de un cultivo de 100 ml se obtienen aproximadamente de 0.6 a 1 mg de proteína purificada.

4.9 Obtención de anticuerpos anti His-*EhRab8*.

Para producir anticuerpos policlonales contra la proteína *EhRab8* se inoculó la proteína recombinante His-*EhRab8* purificada en dos conejos (48 y 49) de la especie Nueva Zelanda durante tres meses. Los títulos de los anticuerpos producidos fueron cuantificados por la técnica de ELISA. La reacción se monitoreo en un lector de ELISA a 405 nm, los datos fueron procesados y graficados con el programa GraphPad Prism. Los conejos tuvieron diferente respuesta al inmunógeno; el título alcanzado por el conejo 48 fue menor al del conejo 49: 71280 y 92890 respectivamente, la Tabla 6 resume los títulos obtenidos.

FECHA	TITULO	
Sangría	48	49
21/9/99	2009	2058
4/10/99	5138	12500
18/10/99	12020	23790
5/11/99	20810	39610
18/11/99	32350	49740
3/12/99 (Blanco)	71280	92890

Tabla 6. Títulos medidos por ELISA

4.10 “Western blot” con suero total.

Para evaluar la sensibilidad de los anticuerpos obtenidos se realizó un análisis por “Western blot” utilizando diferentes cantidades de proteína His-*EhRab8* purificada (50ng-500ng). Como primer anticuerpo se utilizó una dilución 1:500 del suero del última sangrado de cada conejo. La Figura 18 muestra los resultados. Los anticuerpos anti His-*EhRab8* presentes en el suero de ambos conejos detectan 50 ng de proteína His-*EhRab8*.

4.11 Purificación de los anticuerpos.

4.11.1 Expresión de la proteína recombinante His-GFPCOOHRab8.

Para obtener anticuerpos que reconocieran específicamente a la proteína *EhRab8* decidimos purificar los anticuerpos por cromatografía de afinidad utilizando como inmunoadsorbente la región carboxilo terminal de la proteína *EhRab8*. Esta región es la zona menos conservada entre las proteínas Rab, y por lo tanto, le da la especificidad a cada proteína. Para esto se construyó una proteína de fusión en donde las últimas 108 pb ubicadas en el 3' terminal de *EhRab8* se fusionaron en el 3' del gene que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). La secuencia que codifica para el carboxilo terminal de *Ehrab8* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos Rab 8.6 y stop Rab 8.5 (ver Materiales y Métodos). El fragmento amplificado se clonó en los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III del vector pQE30-GFP en el extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína GFP. La proteína recombinante resultante, His-GFPCOOHRab8, fue expresada y purificada de la misma forma que la proteína recombinante His-*EhRab8*. Se analizaron las fracciones de la purificación de la proteína en un gel SDS-PAGE al 15%, en las fracciones correspondientes a la elución se observó una banda de aprox. 27 kDa correspondiente al tamaño esperado. En la Figura 19 se esquematiza la estructura primaria de la proteína His-GFPCOOHRab8.

4.11.2 Acoplamiento de la proteína recombinante a sefarosa 4B-CNBr y purificación de los anticuerpos anti-COOHRab8.

Aproximadamente 1 mg de proteína recombinante His-GFPCOOHRab8 purificada se dializó contra 0.1 M NaCOOH₃ para quitarle el imidazol y el Tris, y tener una composición iónica adecuada para la reacción de acoplamiento. La proteína dializada se acopló a 0.5 gr de sefarosa 4B activada con CNBr. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo entre los grupos amino de la proteína y el bromuro de cianógeno de la sefarosa. La eficiencia de la reacción se sigue por adsorbancia a 280 nm midiendo la cantidad libre de proteína que no se acopla a la resina. La eficiencia del acoplamiento de la proteína recombinante fue de un 90%.

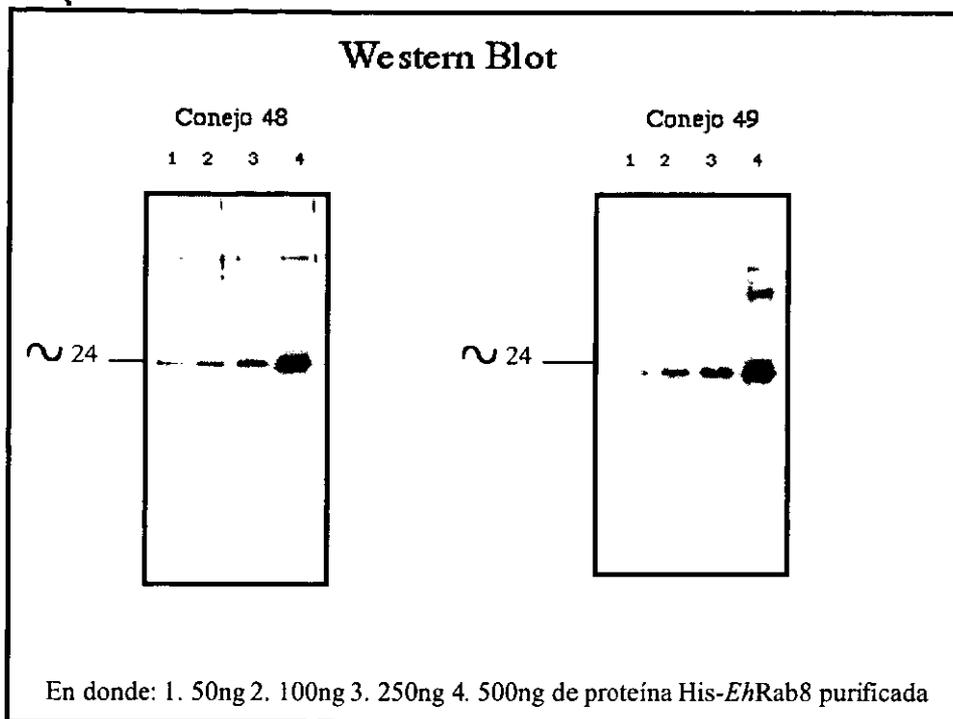


Figura 18 Western Blot con suero total. Se muestra el reconocimiento de diferentes concentraciones de proteína recombinante His-*EhRab8* por los anticuerpos anti His-*EhRab8* presentes en el suero total .

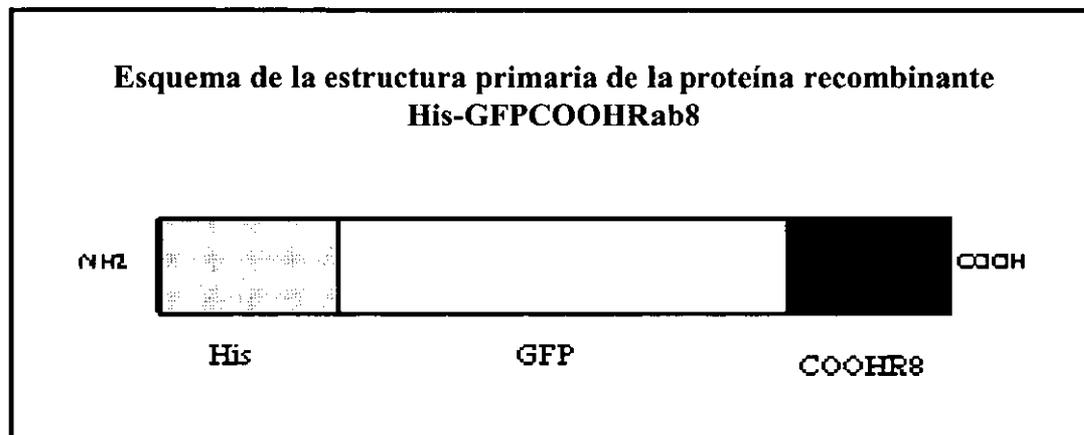


Figura 19 Fusión traduccional del la proteína His-GFP al extremo COOH terminal de *EhRab*. Las Histidinas se representan en gris y la proteína GFP en blanco.

El inmunoadsorbente sefarosa 4B -His-GFPCOOHRab8 se empacó en una columna para purificar por afinidad anticuerpos contra el carboxilo terminal de *EhRab8* a partir del suero de los conejos inmunizados con la recombinante His-*EhRab8*. Se pasaron por la columna 2.5 ml del suero total del último sangrado de cada conejo, los anticuerpos específicos contra el carboxilo terminal se pegan a la columna, son eluidos con ácido acético 0.1M y neutralizados en Tris-HCl 1M. La purificación de los anticuerpos se sigue por absorbancia a 280 nm. A partir de 2.5 ml de suero se obtienen aprox. 0.575 mg/ml de anticuerpos purificados anti-COOHRab8.

4.11.3 Caracterización de los anticuerpos anti-COOHRab8.

Para evaluar si los anticuerpos purificados anti-COOHRab8 reconocen a la proteína Rab8 de amiba, se realizó un análisis por “Western blot”. En el gel se cargaron: lisado de amibas aproximadamente 50,000 células y 50 ng de la proteína recombinante His-*EhRab8*. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizaron las incubaciones correspondientes según la técnica de Western blot. Como primer anticuerpo se utilizó 1 µg/ml de anti-COOHRab8. En la Figura 20 podemos observar los resultados. Los anticuerpos anti-COOHRab8 reconocen a la proteína Rab8 amibiana como una proteína de 23 kDa. Los anticuerpos también reconocen una proteína de un peso molecular aproximado de 50 kDa. Dadas las condiciones de la purificación, esperábamos que los anticuerpos anti-COOHRab8 reconocieran únicamente a la proteína *EhRab8*, por lo que en los siguientes experimentos nos dedicamos a quitar la inespecificidad del reconocimiento de la proteína de 50kDa. El reconocimiento de los anticuerpos purificados del suero de cada uno de los conejos es muy similar, por lo que para los experimentos posteriores se juntaron los sueros de la última sangría de los dos conejos y se purificó más anticuerpo.

Desconocíamos la identidad de la proteína de 50 kDa reconocida por los anticuerpos anti-COOHRab8, una posibilidad podía ser que se tratara de un dímero de la proteína *EhRab8*. Para responder esta pregunta realizamos un “Western blot” de un gel con lisado total de amibas tratado en condiciones no reductoras, es decir las muestras a analizar no son tratadas con β-mercaptoetanol. Los resultados se muestran en la Figura 21. Los anticuerpos reconocieron nuevamente a las dos proteínas. Con los resultados de este experimento

descartamos que la proteína de 50 kDa fuera el dímero de *EhRab8*, ya que de ser así, en condiciones no reductoras la proteína de 50 kDa no sufriría procesamiento de sus puentes disulfuro y por lo tanto en el gel observaríamos una sola banda de alto peso molecular correspondiente al dímero de la proteína *EhRab8*.

Otra posibilidad para explicar el reconocimiento de la proteína de 50 kDa era que la preparación de anticuerpos purificados estuviera contaminada con anticuerpos contra proteínas de *E.coli* que estuvieran reconociendo a la proteína de alto peso molecular en amiba. Esto podía ser posible ya que la proteína recombinante *EhRab8* que se utilizó como inmunógeno se expresó en *E.coli*, y la purificación de la proteína no es al 100%. En la preparación copurifican con la proteína de interés proteínas de alto peso molecular, estas proteínas son poco abundantes por lo cual se esperaba que fueran poco inmunogénicas. Sin embargo se han visto casos de proteínas poco abundantes pero altamente inmunogénicas. Para responder esta interrogante, realizamos un "Western blot" de un gel SDS-PAGE 15% en donde en cada carril se cargó lisado total de amiba. El gel se transfirió a nitrocelulosa y cada carril por separado fue incubado con una mezcla de 1 µg/ml de anticuerpos anti-COOHRab8 + 0, 0.2, 0.5, 1, 2 ó 5 mg/ml de proteínas totales de *E.coli* según el carril. Esta mezcla fue preincubada previamente durante una hora y se utilizó como primer anticuerpo. Los resultados se muestran en la Figura 22. Esperábamos que las proteínas de *E.coli* compitieran con los sitios de reconocimiento de los anticuerpos anti-proteínas de *E.coli* en el caso de que hubiera de este tipo de anticuerpos en la preparación y evitaran el reconocimiento de la proteína de alto peso molecular. Sin embargo, no hubo competencia con las proteínas de *E.coli*, los anticuerpos anti-COOHRab8 siguen reconociendo a las dos proteínas.

Hasta el momento de acuerdo a los resultados de los experimentos anteriores, sabíamos que la proteína de alto peso molecular no era un dímero de la proteína *EhRab8* y sabíamos que nuestra preparación de anticuerpos anti-COOHRab8 no estaba contaminada con anticuerpos anti-proteínas de *E.coli* que reconocieran a la proteína de alto peso molecular en amiba. Estos resultados nos llevaron a pensar que los anticuerpos anti-COOHRab8 tenían una reacción cruzada entre dos proteínas distintas, es decir, los mismos anticuerpos reconocen un epítipo compartido presente en las dos proteínas *EhRab8* y la proteína de 50 kDa.

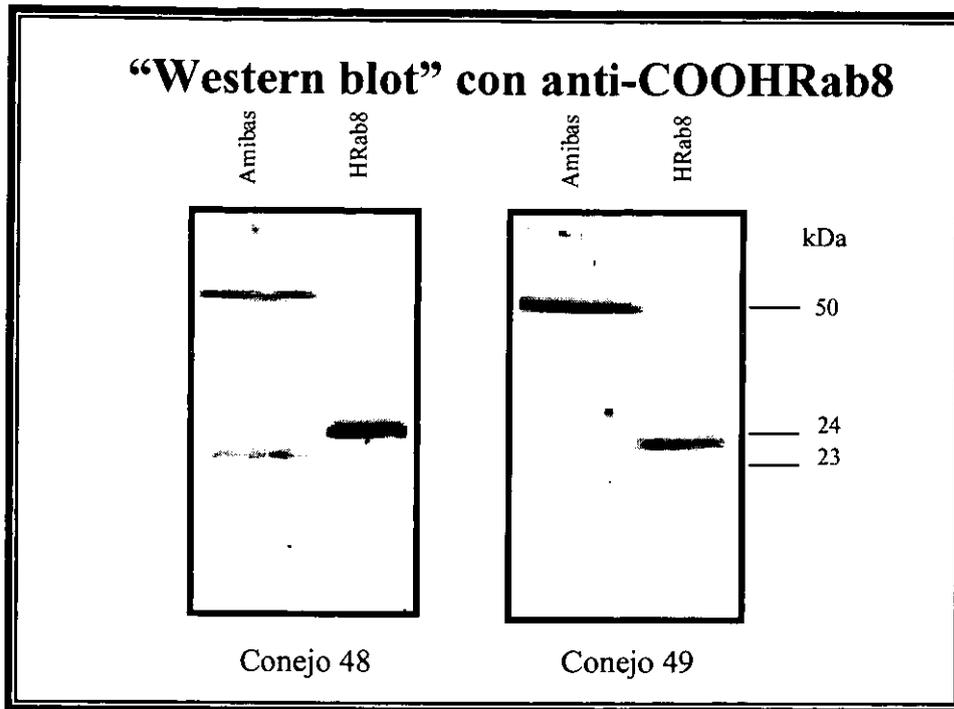


Figura 20. Reconocimiento de los anticuerpos purificados contra el carboxilo terminal de *EhRab8*. Se muestra el reconocimiento de los anticuerpos anti-COOHRab8 purificados de los conejos 48 y 49 inmunizados con His-*EhRab8*. Como primer anticuerpo se utilizó 1 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-COOHRab8.

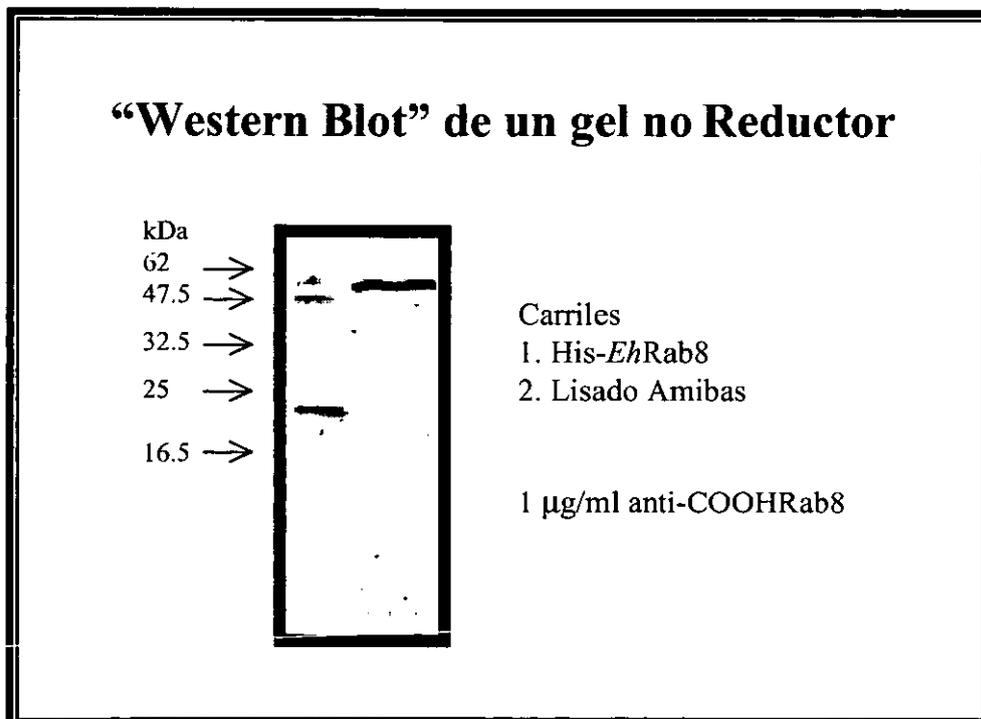


Figura 21. Se muestran los resultados del Western blot de un gel SDS-PAGE al 15% en condiciones no reductoras.

A la par de los experimentos descritos anteriormente se sintetizó un péptido NH₂-CQSAQPGIVDPTQQTQPTE-0H (péptido CRab8 sintetizado por la compañía BIOSYNTHESIS (USA) correspondiente a los aminoácidos 177 a 194 del carboxilo terminal de *EhRab8*) ya que en otros estudios con proteínas Rab de amiba se había utilizado esta región para producir anticuerpos. El péptido se acopló a sefarosa-tiopropilo y se empacó en una columna para purificar anticuerpos antipéptido por afinidad a partir del suero total de los conejos inmunizados con la proteína recombinante His-*EhRab8*. El reconocimiento de los anticuerpos purificados se analizó por el “Western blot” de un gel SDS-PAGE 15% con lisado total de amibas, se realizaron a la par experimentos de competencia con el péptido utilizando como primer anticuerpo en el “Western blot” una mezcla de 1µg/ml de anticuerpos anti-péptido (anti-CRab8/177-194) preincubados durante 1 h con 5 µg/ml del péptido CRab8. La Figura 23 muestra el resultado de este experimento. Los anticuerpos antipéptido reconocen también a las dos proteínas en amiba. Un exceso de péptido CRab8, compite con las proteínas amibianas por el reconocimiento de los anticuerpos antipéptido. Al parecer el péptido se encuentra dentro de la región que reconocen los anticuerpos en las dos proteínas responsable de la reacción cruzada.

El siguiente experimento que hicimos fue pasar por la columna que contiene el inmunoabsorbente sefarosa-tiopropilo-péptido los anticuerpos anti-COOHRab8 previamente purificados. Los anticuerpos se pasaron varias veces por la columna de sefarosa-tiopropilo-péptido para evitar pegados inespecíficos. La fracción con afinidad por el péptido CRab8/177-194 así como la fracción de anticuerpos no pegados a la resina (anticuerpos contra el resto del carboxilo terminal de *EhRab8* es decir, la región entre los residuos 165-176 ó anti-CRab8/165-176) se utilizaron como 1er anticuerpo en un análisis de Western blot. Los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-CRab8/177-194, tal y como había sido observado en experimentos anteriores, reconocen a las dos proteínas de 23 y 50 kDa (resultados no ilustrados). Por el contrario los resultados obtenidos con la fracción no pegada (anticuerpos anti-CRab8/165-176) fueron inesperados: los anticuerpos reconocen únicamente a la proteína *EhRab8* de 23 kDa. No se observó reacción con la proteína de 50 kDa (Figura 24). La Figura 25 resume la estrategia utilizada para obtener anticuerpos específicos contra la proteína *EhRab8*, la región que reconocen los anticuerpos específicamente se encuentra en el carboxilo terminal de *EhRab8* en los aminoácidos 165-176. Serán estos

“Western blot” de los anticuerpos anti-*EhRab8*

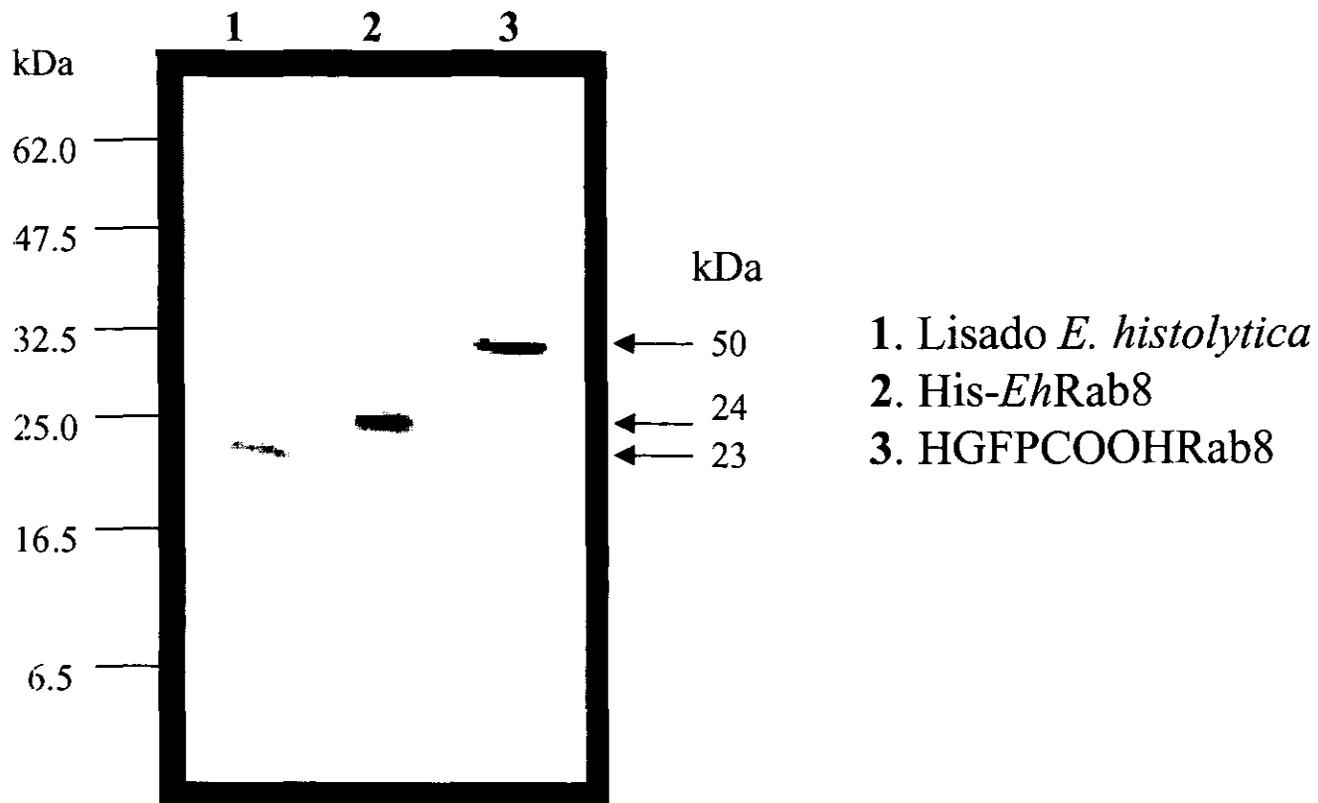


Figura 24. Reconocimiento de Rab8 en lisado de amiba. Los anticuerpos anti-*EhRab8* (anti-CRab8/165-176) reconocen específicamente a la proteína Rab8 amibiana, su masa molecular aproximada es de 23 kDa.

Purificación de anticuerpos anti-*EhRab8*

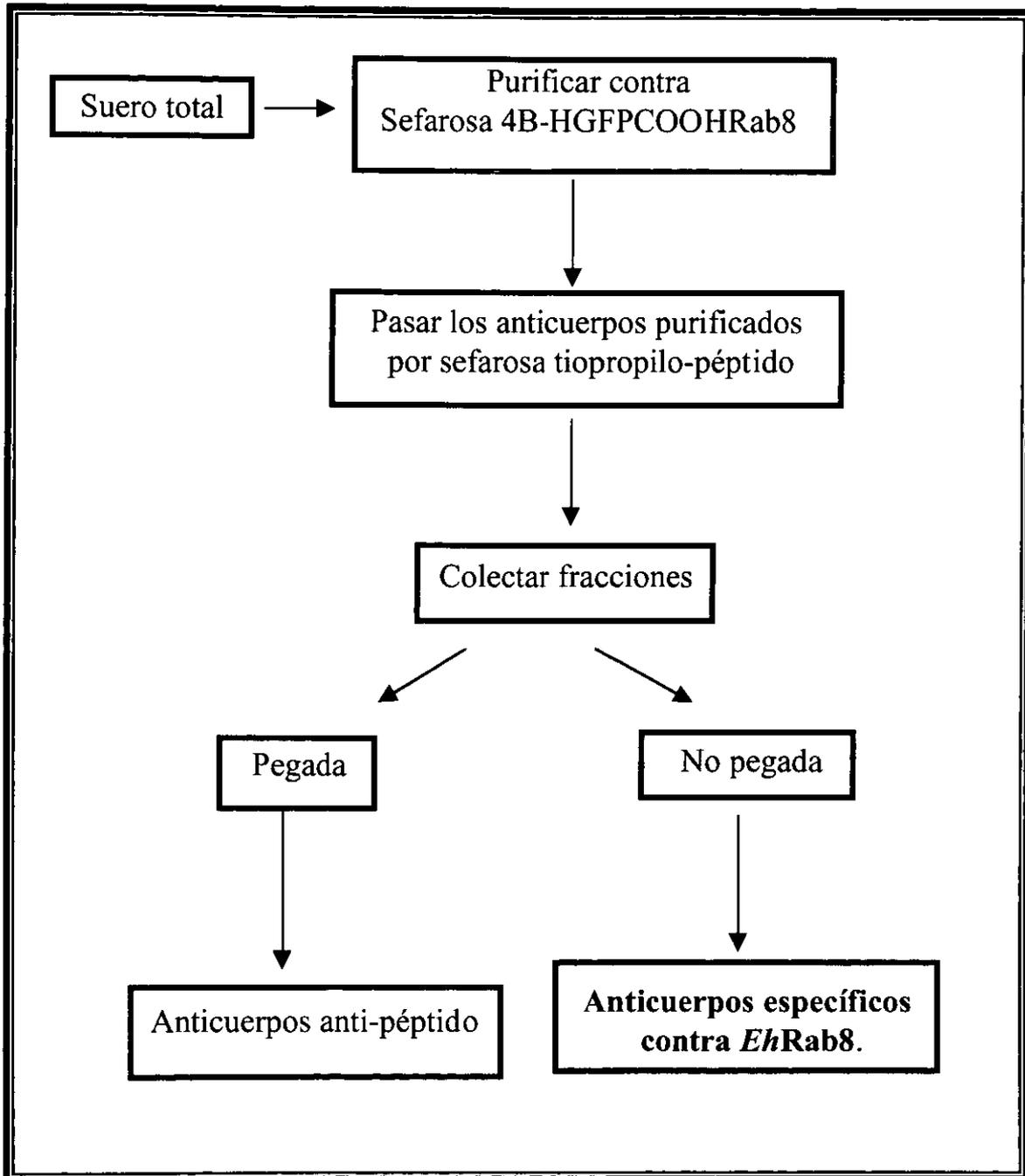


Figura 25. Se muestra la estrategia utilizada para purificar anticuerpos específicos contra *EhRab8*.

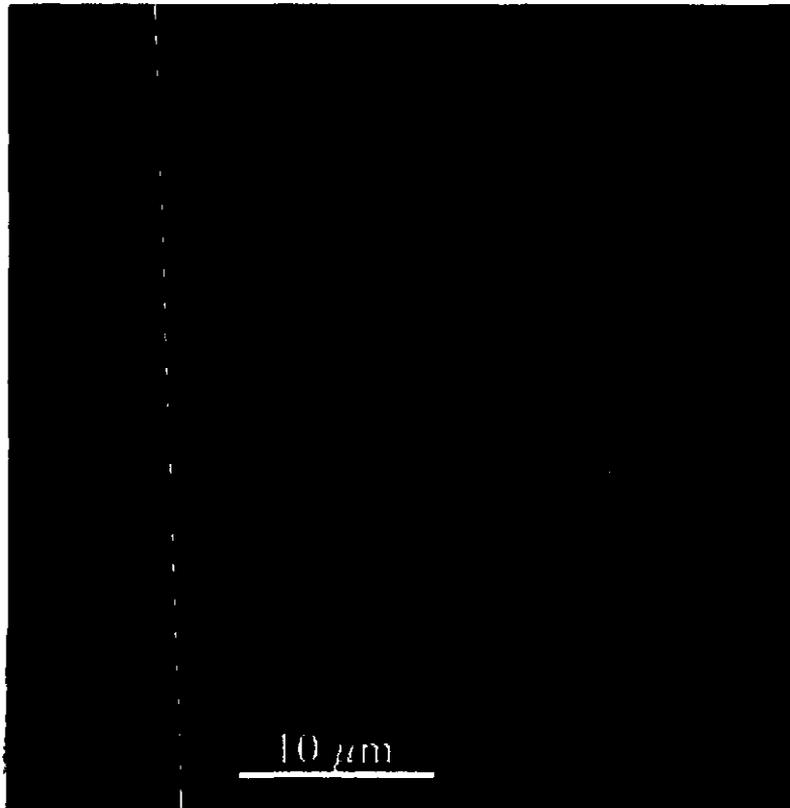
anticuerpos, en lo sucesivo denominados anti-*EhRab8*, los que utilizemos en experimentos de citolocalización.

4.12 Citolocalización

Teniendo los anticuerpos específicos contra *EhRab8*, el siguiente paso fue localizar a la proteína Rab8 en amiba. La localización se llevó a cabo por inmunocitoquímica en un microscopio confocal. Los trofozoítos de amiba se incubaron con 5 µg/ml de anticuerpos anti-*EhRab8*. Se realizaron tinciones dobles con PI (Yoduro de propidio) para observar el núcleo. Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal fueron procesadas con la colaboración del Dr. Roberto Stock utilizando el programa Voxel View (Vital Images, Inc) que permite la reconstrucción de volúmenes en 3D. Los resultados ilustrados en la Figura 26 muestran dos imágenes en donde se aprecia la localización de *EhRab8*. La figura 26 A es una proyección plana de un trofozoito de amiba mientras que la Figura 26 B muestra 5 cortes ecuatoriales de la proyección plana. *EhRab8* se localiza en estructuras vesiculares pequeñas y mayoritariamente en la membrana plasmática. Las observaciones son reproducibles en todas las células analizadas y la localización encontrada es similar a la reportada para otros organismos.

Localización de la proteína Rab8 en amiba

A



B

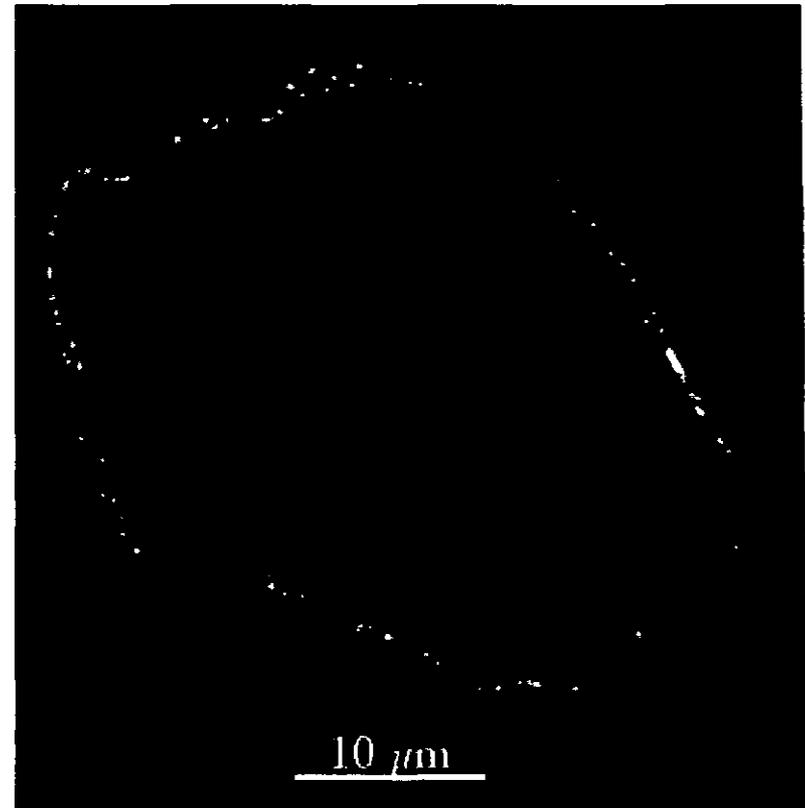


Figura 26. Localización de Rab8 amibiana. A. Muestra una proyección plana de la proteína Rab8 en amiba, en verde se muestra a *Ehrab8*, en rojo se muestra el núcleo del trofozoito teñido con PI. B. Muestra la proyección de 5 cortes ecuatoriales en donde se observa la distribución periférica de *EhRab8*.

V DISCUSION

Entamoeba histolytica es el parásito protozoario causante de la amibiasis humana. La amiba es considerada como un eucariote primitivo ya que entre otras características, estructuralmente es bastante simple, no cuenta con los elementos típicos de la maquinaria secretora observada en eucariotes superiores como son RE y Aparato de Golgi. La patogenicidad de este parásito está asociada a su alta actividad secretora y una de las interrogantes más grandes en este parásito es conocer los detalles del mecanismo que utiliza para llevar a cabo el tráfico de proteínas, que ha sido poco estudiado. En vista del importante papel que juegan las proteínas Rab/YPT en la regulación del tráfico vesicular y su utilidad como marcadores específicos de compartimentos a lo largo de la vía secretoria, decidimos caracterizar a la proteína Rab8 de *E. histolytica* con el objeto de contar con un marcador tardío del tráfico de proteínas en este parásito.

5.1 Clonación y secuenciación del gene *Ehrab8*

En este trabajo se aisló el gene *Ehrab8* a partir de un tamizado en un banco genómico de *E. histolytica* utilizando como sonda un fragmento reportado como un EST. La identidad del gene aislado se determinó realizando los siguientes análisis: análisis de homología utilizando el programa BLAST tanto de la secuencia nucleotídica como la deducida en aminoácidos, alineamientos con proteínas tipo Rab8 mediante el programa GeneWorks, identificación a nivel de secuencia primaria de los motivos estructurales de unión a GTP conservados entre las GTPasas y de motivos estructurales característicos de proteínas Rab, tales como motivos RabF, dominio efector y motivo Cys-Cys. De acuerdo a los resultados de los análisis realizados podemos afirmar que el gene amibiano aislado es un gene homólogo a rab8/SEC4. Es posible que el gene *Ehrab8* sea altamente expresado en amiba ya que la técnica de EST aísla principalmente genes con un alto nivel de expresión, lo cuál estaría de acuerdo con su función como regulador del tráfico vesicular.

La secuencia codificante del gene *Ehrab8* es de 600 pb. En base a los datos de la composición nucleotídica podemos observar que la región codificante es rica en los nucleótidos A y T, principalmente en la tercera posición del codon, característica conservada en los genes amibianos [Bruchhaus et al, 1993]. El

análisis de la secuencia obtenida mostró la presencia de un intrón de 58 pb flanqueado por los nucleótidos GT y AG, secuencias donadoras yceptoras conservadas, características de "splicing" en eucariotes. Las características que presenta el intrón de *Ehrab8* son las observadas en otros intrones, es pequeño, menor de 100 nucleótidos y muestran los nucleótidos característicos de "splicing" encontrados en intrones de eucariotas superiores [Bhattacharya, 2000]. La presencia de intrones en genes de amiba es poco común por lo que *Ehrab8* se une al reducido grupo de genes que contienen intrones. Durante mucho tiempo se pensó que los genes de amiba no contenían intrones, la identificación de éstos sugiere la presencia de procesos más avanzados en la genética del parásito que no eran conocidos. La presencia de intrones en genes de transporte de amiba no es muy clara, pero dada la utilización de estos genes quizás las amibas desarrollaron un mecanismo para preservar estos genes que le son esenciales para sus fenómenos vitales.

El uso de codones de *Ehrab8* fué analizado utilizando el programa Codon Preference del paquete GCG. La secuencia de *Ehrab8* fue comparada contra la tabla de uso de codones de *E. histolytica* del programa. *Ehrab8* muestra un uso de codones preferencial de *E. histolytica* conservado en el primer marco de lectura, corroborando de esta forma que el gene aislado es un gene amibiano.

5.2 Elementos regulatorios del gene *Ehrab8*

Los elementos regulatorios en la región 5' no traducida del gene *Ehrab8* incluyen 2 cajas TATA putativas TATAATTA y TATTAATT identificadas por homología con la caja TATA consenso TATTTAAA reportada en amiba [Bruchhaus et al, 1993], una caja CAAT putativa identificada por homología con la secuencia consenso para otros eucariotes. El sitio de inicio de la transcripción se determinó experimentalmente por 5' RACE. La secuencia de inicio de la transcripción AAAA se encontró a -11 pb corriente arriba del inicio de la traducción (ATG), la secuencia encontrada difiere de las secuencias consenso ATCA/ATTCA reportadas para otros genes de amiba [Bruchhaus et al, 1993]. De acuerdo a alineamientos de la secuencia genómica de *Ehrab8* y la secuencia obtenida por 5' RACE se observó que el RNA mensajero sufre un proceso de maduración por "capping". El proceso de maduración por capping ha sido poco observado en los genes de amiba, el hecho de que *Ehrab8* presente este proceso es

muy interesante ya que además de confirmar la existencia de este tipo de procesos en amiba nos hace pensar en que la amiba a pesar de considerarse un organismo primitivo cuenta con este tipo de procesos especializados observados en eucariotes superiores. El gene *Ehrab8* presenta una señal consenso de poliadenilación CATT similar a la reportada para otros genes de amiba [Bruchhaus et al, 1993],

5.3 Secuencia polipeptídica deducida y homología de *EhRab8*

La identidad a nivel de proteína de *EhRab8* con sus homólogos en otros organismos es bastante alta (de 47% a 63%), el porcentaje mayor de identidad (63%) se observa con *C. elegans*, seguido por *S. pombe* y *D. discoideum* (62% y 61%, respectivamente), lo cuál nos habla acerca del alto grado de conservación de este gene a lo largo de la escala evolutiva.

La proteína *EhRab8* muestra las características típicas de las proteínas Rab. Contiene los cuatro motivos involucrados en la unión a GTP: GESGVGKS, DTAGQ, NKCD Y ETSAK altamente conservados. En su carboxilo terminal presenta dos residuos cisteína, a diferencia de otros homólogos como Rab8 en mosca y rata que presentan solo un residuo cisteína. A pesar del alto grado de identidad entre las proteínas Rab en la región que contiene los motivos de unión a GTP, la especificidad de cada Rab esta determinada por su carboxilo terminal y el loop efector, los cuales son únicos para cada proteína Rab. En nuestro caso estamos seguros que clonamos el gene que codifica para *EhRab8* y no para otra Rab porque la sonda utilizada para pescar el gene contiene el loop efector de la proteína (por lo que asumimos que es específica para *EhRab8*) y por las condiciones de alta astringencia utilizadas en el tamizado. La identidad de *EhRab8* fué confirmada por los análisis antes mencionados.

Por otro lado, los resultados sugieren que la proteína *EhRab8* es funcional en amiba ya que se expresa y es reconocida por los anticuerpos generados contra ésta. En estudios futuros se pretende caracterizar a nivel funcional a *EhRab8*, evaluando su capacidad para unir e hidrolizar GTP y estudios de complementación en levadura.

5.4 “Northern blot” y “Southern blot”

Desde un inicio sabíamos que el gene *Ehrab8* se expresaba en amiba ya que un fragmento del gene fue identificado a partir de un EST de amiba; sin embargo, para conocer el tamaño del transcrito del gene utilizamos la técnica de “Northern blot”. Como sonda utilizamos las últimas 150 pb ubicadas en el extremo 3’ de la secuencia de *Ehrab8*. Utilizamos esta secuencia debido a que es la región mas variable a nivel de proteína entre las proteínas Rab asegurando mayor especificidad en la detección. *Ehrab8* se expresa como un transcrito único de 0.725 Kb.

El número de copias del gene *Ehrab8* en amiba se determinó por la técnica de “Southern blot”. El gene *Ehrab8* se encuentra como copia única en el genoma de la amiba. Se ha observado en algunos eucariotes la duplicación de genes que codifican para proteínas muy utilizadas por el organismo. La amiba es un organismo con una alta actividad secretora, por lo que los genes que codifican para proteínas que participan en el transporte seguramente son muy utilizados, sin embargo en el caso de *Ehrab8* es suficiente con una única copia para los requerimientos de la amiba.

5.5 Obtención y caracterización de anticuerpos anti-*EhRab8*.

Para obtener anticuerpos específicos contra la proteína *EhRab8*, purificamos los anticuerpos contra el carboxilo terminal de *EhRab8*, esta región es la más variable entre las proteínas Rab y esperábamos purificar anticuerpos que reconocieran únicamente a *EhRab8*. Los anticuerpos purificados reconocieron a *EhRab8* pero también reconocieron a una proteína de 50 kDa específica de amiba ya que no es reconocida en *E.coli*. De acuerdo a los resultados de los experimentos realizados nos dimos cuenta que nuestros anticuerpos reconocían un epítipo compartido en las dos proteínas. La proteína de 50 kDa no fue caracterizada ya que no era el objetivo de este trabajo, si bien queda abierta la posibilidad de que sea una proteína involucrada en transporte que interactúa con *EhRab8*. Sería muy interesante poder probarlo. Sin embargo, también existe la posibilidad que sólo tenga el epítipo por azar y no esté relacionada con nuestra proteína de interés.

En los estudios realizados con proteínas Rab reportados en mamífero y levadura, los anticuerpos por lo general los producen utilizando péptidos sintéticos diseñados a partir de la región carboxilo terminal de la proteína y de esta manera obtienen anticuerpos específicos, o bien realizan fusiones traduccionales del gene de interés con una etiqueta comercial (como HA) y los anticuerpos que utilizan van dirigidos contra ésta. En nuestro caso inexplicablemente una parte del carboxilo terminal resultó ser compartida por dos proteínas, sin embargo después de muchos experimentos fallidos logramos encontrar una estrategia para purificar anticuerpos específicos contra *EhRab8*.

5.6 Citolocalización de la proteína *EhRab8*

Las proteínas Sec4/Rab8 juegan un papel esencial en la etapa final de la ruta secretoria [Salminen y Novick, 1987; Pfeffer, 1992]. La localización de estas proteínas ha sido estudiada con mutantes termosensibles y estudios de microscopía confocal inmunofluorescente y microscopía inmunoelectrónica [Walworth et al, 1989; Huber et al, 1993]. Los estudios indican que las proteínas Sec4/Rab8 se localizan en la región Golgi, estructuras vesiculares y la membrana plasmática.

La localización de la proteína *EhRab8* en amiba fue estudiada por microscopía confocal inmunofluorescente utilizando los anticuerpos específicos contra la proteína. *EhRab8* se localizó en estructuras vesiculares y mayoritariamente cerca de la membrana plasmática. La localización observada es consistente con la de sus homólogos en otros organismos como mamífero y levadura. Al igual que otras proteínas Rab amibianas, *EhRab8* se localiza en pequeñas vesículas pero tiene una localización periférica muy marcada lo que sugiere la participación de la proteína *EhRab8* en procesos regulatorios en la etapa final de la secreción entre el trans-Golgi y la membrana plasmática.

En amiba se ha reportado la identificación de proteínas Rab involucradas en endocitosis tales como las proteínas Rab7, Rab11, Rab5 localizadas en compartimentos endosomales de *E. histolytica* y RabB implicada en endocitosis [Temesvari et al, 1999]; [Saito-Nakano et al, 2000]; [Rodríguez et al, 2000]. La proteína RabA también ha sido identificada [Temesvari et al, 1999] pero no se conoce aún su función. Junto con estos datos se suma la caracterización de la proteína Rab8 realizada por nuestro laboratorio. Dado que la proteína Rab8

participa en el proceso de regulación del tráfico vesicular a la membrana plasmática su estudio servirá como una herramienta muy importante para la caracterización de la regulación de la etapa final de tráfico vesicular en amiba. El hallazgo de proteínas especializadas en un punto particular del tráfico de proteínas como las proteínas Rab y otras proteínas que participan a la largo de la vía secretora nos permite especular acerca de como se encuentra organizada la maquinaria de tráfico de proteínas amibiana. Al parecer la amiba, a pesar de ser un organismo muy simple a nivel estructural y bioquímico, contiene los elementos indispensables para llevar a cabo el transporte de proteínas de manera análoga a la presente en organismos más avanzados. La caracterización de marcadores moleculares específicos de compartimentos y transporte en amiba nos permitirá llevar a cabo la caracterización de la maquinaria secretora del parásito y poder discernir en un futuro acerca de la existencia de los equivalentes funcionales a compartimentos membranosos en amiba y la caracterización del transporte vesicular.

VI Conclusiones

En la presente tesis hemos caracterizado al gene *rab8* de *Entamoeba histolytica*. Obtuvimos la secuencia completa del gene, lo expresamos como proteína recombinante y generamos anticuerpos específicos que nos permitieron citolocalizar a la proteína Rab8 en amiba. Las conclusiones obtenidas se listan a continuación:

1. **Hemos obtenido la secuencia completa del gene *Ehrab8***, el marco abierto de lectura del gene *Ehrab8* es de 600 pb interrumpido por un intrón de 58 pb flanqueado por las secuencias consenso en células eucariotes. El inicio de la transcripción de *Ehrab8* se encuentra a -11 pb río arriba del inicio de la traducción. El uso de codones del gene es característico de amiba.
2. **Northern y Southern blot.** El gene *Ehrab8* se expresa como un transcrito de 0.725 Kb y se encuentra como copia única en el genoma de *Entamoeba histolytica*.
3. **Secuencia polipeptídica deducida.** La secuencia nucleotídica del gene predice un polipéptido de 200 aa con una masa molecular de 22 272 daltons. Los alineamientos realizados de la secuencia de *EhRab8* con sus homólogos indican identidades entre un 47% y un 63%. A nivel de la estructura primaria fueron identificados en la secuencia amibiana motivos característicos de la familia de las proteínas Rab como son los motivos de unión a GTP, los motivos RabF y el motivo Cys-Cys en el carboxilo terminal.
4. **Localizamos a la proteína Rab8 en amiba.** Generamos anticuerpos específicos contra la proteína His-*EhRab8*. La proteína Rab8 amibiana se localiza en estructuras vesiculares en la periferia celular.

VII Perspectivas

En este momento contamos con un marcador tardío de la ruta secretoria en amibas, este marcador junto con otros ya caracterizados en el laboratorio, se utilizará como herramienta en estudios de microscopía electrónica y confocal para contribuir a la caracterización de la ruta secretoria de *E. histolytica*. En un futuro sería muy interesante comenzar a hacer estudios de fraccionamiento subcelular e inmunoprecipitación para caracterizar las vesículas en donde se localiza la proteína e identificar las proteínas efectoras con las que interactúa. De igual forma el estudio de antisentidos contra *EhRab8* será una herramienta muy valiosa para la caracterización funcional de la proteína en amiba.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VIII BIBLIOGRAFIA

Antony C., Cibert C., Geraud G., Santa Maria A., Maro B., Mayau V., Goud B. 1992. The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the *trans*-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* 103: 785-796.

Alexandrov K., Horiuchi H., Steele M.O. Seabra M.C and Zerial M. 1994. *EMBO J.* 13: 5262-5273.

Arhets P, Gounon P, Sansonetti P and Guillen N. 1995. Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity.* 63: 4358-4367.

Azam A., Paul J., Sehgal D., Prasad J., Bhattacharya S., Bhattacharya A. 1996. Identification of novel genes from *Entamoeba histolytica* by expressed sequence tag analysis. *Gene* 181, 113-116.

Baker D., Wuestehube L., Schekman R., Botstain D., Segev N. 1990. GTP-binding Ypt1 protein and Ca²⁺ function independently in a cell-free protein transport reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 355-359.

Benli M., Doring F., Robinson D.G., Yang X., Gallwitz D. 1996. Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J.* 15: 6460-6475.

Bennett M. and Scheller R. 1993. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad.* 90: 2559-2563.

Bhattacharya A., Satish S., Bagchi A., Bhattacharya S. 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology,* 30: 401-410.

Boguski M.s., McCormick F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-54.

Braga L.L., Ninomiya H., McCoy J.J., Eacker S., Weidmer T., Pham C., Wood S., Sims P., Petri W.A. Jr. 1992. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 1131-1137.

Brennwald P. and Novick P. 1993. Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* 362: 560-563.

Brennwald P., Kerans B., Champion K., Keranen S., Bankaitis V., Novick P. 1994. Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* 79: 245-258.

Bruchhaus I., Leippe M., lioutas C., Tannich E. 1993. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol.* 12: 925.

Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70: 715-728.

Caballero A., Viveros M., Salvatierra B., Tapia R., Sepúlveda J., Gutierrez G., Ortíz-Ortíz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 412.

Calakos N., Schell RH. 1994. Vesicle associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle. *J. Biol. Chem.* 269: 24534-37.

Chavrier P., Grovel J.P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J., Zerial M. 1991. *Nature* 353: 762-769.

Chavrier P., Parton R.G., Hauri H.P., Simons K., Zerial M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62: 317-329.

Chavrier P., Vingron M., Sander C., Simons K., Zerial M. 1990. Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10: 6578-6585.

Chen Y.T., Holcomb C., Moore H.P. 1993. Expression and localitation of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6508-6512.

Darchen F., Zahraoui A., Hammel F., Monteils M.P., Tavitian A., Scherman D. 1990. Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5692-5696.

Deretic D. and Papermaster D.S. 1993. Rab6 is associated with a compartment that transport rhodopsin from the trans-Golgi to the site of rod outer segment disk fomation in retinal photoreceptors. *J. Cell Sci.* 106: 803-813.

Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med hig*, 72: 431-2.

Ferro-Novick S. and Novick P. 1993. The role of GTP-binding proteins in transport along the exocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 575-99.

Fischer von Mollard G., Mignery G.A., Baumert M., Perin M.S., Hanson T.J., Burger P.M., Jahn R., Südhof T.C. 1990. Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1988-1992.

Fischer von Mollard G., Stahl B., Khokhlatchev A., Sudhof T.C., Jahn R. 1994. Rab3C is a synaptic vesicle protein that dissociates from synaptic vesicles after simulation of exocytosis. *J Biol Chem.* 269: 10971-10974.

Gallwitz D., Donath C., Sander C. 1983. A yeast gene encoding a protein homologuos to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature* 306: 704-707.

Gething M.J. and Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45

Gonzalez L. and Scheller R.H. 1999. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96: 755-758.

Gorvel J., Chavrier P., Zerial M., Gruenberg J. 1991. Rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* 64: 915-925.

Goud A., Salminen A., Walworth N.C., Novik P.J. 1988. A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* 53: 753-768.

Goud A., Zahraoui A., Tavitian A., Saraste J. 1990. Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345: 553-556.

Gutierrez G., Ludlow A., Espinoza G., Herrera S., Muñoz N., Rattoni N., Sepúlveda B. 1976. National Serologic Survey. II Search for antibodies against *Entamoeba histolytica* in México (Sepúlveda, B. and Diamond, L.S., eds),. Proceedings of the international conference on amebiasis, México: Instituto Mexicano del Seguro Social, pp 609.

Hall A. 1990. The cellular function of small GTP-binding proteins. *Science* 249: 635-40.

Holz RW, Brondyk WH, Senter RA, Kuizon L, Macara IG. 1994. Evidence for the involvement of Rab3A in Ca(2+)- dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 269: 10229-10234.

Horiuchi H., Giner A., Hoflack B., Zerial M. 1995. A GDP/GTP exchange-stimulatory activity for the rab5-rabGDI complex on clathrin-coated vesicles from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 270: 11257-11262.

Hubert L.A., Pimplikar S., Parton R.G., Virta H., Zerial M., Simons K. 1993. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* 123: 35-45.

Hurtley S. and Helenius A. 1989. Protein Oligomerization In The Endoplasmic Reticulum *Annu. Rev. Cell. Biol.* 5: 277-307.

Jedd G., Richardson C., Litt R., Segev N. 1995. The Ypt1 GTPase is essential for the first two steps of the yeast secretory pathway. *J. Cell Biol.* 131: 583-590.

Jasmin B., Goud B., Carmus G., Cartaud J. 1992. The low molecular weight guanosine triphosphate-binding protein rab6p associates with distinct post-Golgi vesicles in *Torpedo marmorata* electrocytes. *Neuroscience* 49: 849-855.

Johannes L., Lledo P.M., Roa M., Vincent J.D., Henry J.P., Darchen F. 1994. The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 13: 2029-2037.

Kornfeld R. and Korfeld S. 1985. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides *Annu Rev. Biochem.* 54: 631-664.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lazar T., Götte M., Gallwitz D. 1997. Vesicular transport: How many YPT/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?. *TIBS.* 22: 468-472

Leippe M., Ebel S., Schoenberger O.L., Horstmann R.D., Müller-Eberhard H.J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7659.

Li B. and Warner J.R. 1996. Mutation of the Rab 6 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, YPT6, inhibits both early Golgi function and ribosome biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271: 16813:16819.

Li G.P. and Stahl P.D. 1993. Structure-function relationship of the small GTPase rab5. *J. Biol. Chem.* 268: 24475-24480.

Lledo P.M., Vernier P., Vinvent J.D., Mason W.T., Zorec R. 1993. Inhibition of Rab3b expression attenuates Ca²⁺-dependant exocytosis in rat anterior pituitary cells. *Nature* 364: 540-544.

Lombardi D., Soldati T., Riederer M.A., Goda Y., Zerial M., Pfeffer S.R. 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* 12: 677-682.

Lutcke A., Jansson S., Parton R.G., Chavrier P., Valencia A., Huber L.A., Lehtonen E., Zerial M. 1993. Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. *J. Cell Biol.* 121: 553-564.

Mage T. and Newman C. 1992. The role of lipid anchors for small G proteins in membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* 2: 318-323.

Marshall M.S. 1993. *Trends Biochem Sci.* 18:250-54.

Martinez O. and Goud B. 1998. Rab proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 101-112.

Martinez O., Antony C., Pehau-Arnaudet G., Berger E.G., Salamero J., Goud B. 1997. GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1828-1833.

Martinez O., Schmith A., Salamero J., Hoflack B., Roa M., Goud B. 1994. The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J. Cell Biol.* 127: 1575-1588.

Martínez-Palomo A., González-Robles A., Chávez B., Orozco E., Fernández-castelo S., Cervantes A. 1986. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 32:166-175.

Martínez-Palomo A. 1988. Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives in P.T. Englund, A. Sher and A.R. Liss (eds): *The biology of parasitism*. New York: Copyright, pp. 61-76.

Mayer A. and Wickner W. 1997. Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NFS). *J Cell Biol.* 136: 307-317.

McLaughlin J, Aley S. 1985. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *Protozool* 32:221-240.

Meza I, Torres-Guerrero HK, Meraz MA. 1990. Molecular organization of *Entamoeba histolytica*. In Kretschmer R, Ed Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. Boca Raton, FL: CRC Press. 123: 46-51.

Muñoz ML, Lamoyi E, Leon G, Tovar R, Perez-Garcia J, De La Torre M, Murueta E, Bernal RM. 1990. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. *Clin Microbiol.* 28:2418-2424.

Novick P., Field C. and Schekman R. 1980. Identificación of 23 complementacion groups required for post-translational events in the secretory pathway. *Cell* 21:205-15

Novick P., Field C. and Schekman R. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25: 461-469.

Nuoffer C., Davidson H.W., Metteson J., Meinkoth J., Balch W.E. 1994. A GDP-bound form of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J Cell Biol.* 125: 225-237.

Olkkonen V.M., Dupree P., Killisch I., Lutke A., Zerial M., Simons K. 1993. Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *J. Cell Sci.* 106: 1249-1261.

Pai E.F., Kabsch W., Krengel U., Holmes K.C., John J., Wittinghofer A. 1989. Structure of the guanine-nucleotide binding domain of the Ha ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341: 209-14.

Palade G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347-358.

Papini E., Satin B., Bucci C., de Bernard M., Telford J.L., Manetti R., Rappouli R., Zerial M., Montecucco C. 1997. The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J.* 16: 15-24.

Peffer S.R. 1994. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 522-526.

Peffer S.R. 1996. Transport vesicle docking: SNARE and Associates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 441-61.

Pelham H. 1989. Control Of Protein Exit From The Endoplasmic Reticulum *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 1-23.

Pereira-Leal J.B. and Seabra M. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: Definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* 301: 1077-1087.

Pérez-Monfort R., Saavedra-Lira E. 1994. Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 142: 249-51.

Pind S.N., Nuoffer C., McCaffery J.M., Plutner H., Davidson H.W., Farquhar M.G., Balch W.E. 1994. Rab1 and Ca²⁺ are required for the fusion of carrier vesicles mediating endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Cell Biol.* 125: 239-252.

Peranen J., Auvinen P., Virta H., Wepf R., Simons K. 1996. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 135: 153-167.

Plutner H., Davidson H.W., Saraste J., Balch W.E. 1992. Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *J Cell Biol.* 119: 1097-1116.

Pryer N., Wuestehube L. and Schekman R. 1992. Vesicle-Mediated Protein Sorting *Annu. Rev. Biochem.* 61: 471-516.

Ramos M.A., Mercado G.C., Salgado L.M., Sanchez-Lopez R., Stock R.P., Lizardi P.M., Alagón A. 1997. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88: 225

Ravdin J.I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8:247.

Riederer M.A., Soldati T., Shapiro A.D., Lin J., Peffer S.R. 1994. Lysosome biogenesis requires rab9 function and receptor recycling from endosomes to the *trans*-Golgi network. *J. Cell Biol.* 125: 573-582.

Rodríguez M. A., García-Peréz R. M., García-Rivera, G. López-Reyes I. Mendoza L., Ortiz-Navarrete V. and Orozco E. 2000. An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular localization. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 108:199-206.

Rothblatt J., Novick P. and Stevens T. 1994. Guidebook to the secretory pathway. London: Oxford University Press. USA.

Rothman J. and Orci L. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355: 409-415

Rothman J.E. and Warren G. 1994. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* 4: 220-233.

Saito-Nakano Y., Yasuda T., Shigeta Y., Nakazawa M., Takeuchi T. and Nozaki T. 2000. Identification and characterization of a Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. Archives of Medical Research 31. S155-S156.

Salminen A. and Novick P.J. 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. Cell 49: 527-538.

Sanchez-Lopez R., Gama-Castro S., Ramos M.A., Merino E., Lizardi P.M., Alagón A. 1998. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. Mol. Biochem. parasitol. 92: 355.

Saraste J., Lahtinen U., Goud B. 1995. Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. J. Cell Sci. 108: 1541-1552.

Schimmoller F., Riezman H. 1993. Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. J Cell Sci. 106: 823-830.

Seabra M.C. 1998. Membrane Association and Targeting of prenylated Ras-like GTPases. Cell. Signal. Vol. 10. 3:167-172

Seabra M.C., Brown M.S., Slaughter C.A., Sjödhof T.C., Goldstein J.L. 1992. Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: Possible Identity with Choroidemia gene product. Cell 70: 1049-1057.

Segev N., Mulholland J., Botstein D. 1988. The yeast GTP-binding YTP1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretory machinery. Cell 52: 915-924.

Sepúlveda B., Martínez-Palomo A. 1984. Amebiasis. En K.S. Warren y A.A.F. Mahmoud (eds): Tropical and Geographical Medicine. New York: McGraw-Hill, pp. 305-318.

Shen F and Seabra C. 1996. Mechanism of Digeranylgeranylation of Rab proteins. The Journal of Biological Chemistry 272. No. 7. 16:3692-3698.

Singer-Kruger B., Stenmark H., Dusterhoft A., Philippsen P., Yoo J.S., Gallwitz D., Zerial M. 1994. Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J. Cell Biol.* 125: 283-298.

Söllner T., Bennett MK., Whiteheart SW, Scheller RH., Rothman JE. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-18.

Stanley S.L., Zhang T., Rubin D., Li E. 1995. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 63: 1587-1590.

Sprang S.R. 1997. G protein mechanisms: Insights from Structural Analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66:639-78.

Stenmark H., Parton R.G., Steele-Mortimer O., Lutcke A., Gruenberg J., Zerial M. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13: 1287-1296.

Temesvari L.A., Harris E.N., Stanley S.L., Cardelli J.A. 1999. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol.* 103:225-41.

Tisdale, E.J., Bourne J.R., Khosravi-Far R., Der C.J. and Balch W.E. 1992. GTP-binding mutants of Rab1 and Rab2 are potent inhibitors of vesicular transport for endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol.* 119:749-761.

Tixier-Vidal A., Barret A., Picart R., Mayau V., Voqt D., Wiedenman B., Goud B. 1993. The small GTP-binding protein rab6p is associated with both Golgi and post-Golgi synaptophysin-containing membranes during synaptogenesis of hypothalamic neurones in culture. *J. Cell Sci.* 105: 935-947.

Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. 1991. Chromatin organization of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 45:121.

Tsukada M. and Gallwitz D. 1996. Isolation and characterization of SYS genes from yeast, multicopy suppressors of the functional loss of the transport GTPase Ypt6p. *J. Cell Sci.* 109: 2471-2481.

Ullrich O., Reinsch S., Urbe S., Zerial M., Parton R.G. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135: 913-924.

Urbe S., Huber L.A., Zerial M., Tooze S.A., Parton R.G. 1993. Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* 334: 175-182.

Van der Sluijs P., Hull M., Webster P., Male P., Goud B., Mellman I. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70: 729-740.

Walsh J.A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228.

Walworth N.C., Goud B., Kabcenell A.K., Novick P.J. 1989. Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J.* 8: 1685-1693.

Weber E., Berta G., Tousson A., St John P., Green M.W., Gopalokrishnan U., Jilling T., Sorscher E.J., Elton T.S., Abrahamson D.R. et al. 1994. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 125: 583-594.

Wichmann H., Hengst L., Gallwitz D. 1992. Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ytp7p). *Cell* 71: 1131-1142.

Wilson A. L., Erdman R.A., Castellano F and Maltese W.A. 1998. Prenylation of Rab8 GTPase by type I and type II geranylgeranyl transferases. *Biochem. J.* 333:497-504.

Zahraoui A., Joberty G., Arpin M., Fontaine J.J., Hellio R., Tavitian A., Louvard D. 1994. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 124: 101-115.