



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ Estudio funcional de la proteína Eh-L10 de Entamoeba histolytica ”

290925

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO.

P R E S E N T A :

LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MIGUEL ANGEL VARGAS MEJÍA.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCIÓN ESCOLAR

México D.F. Abril 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" Estudio Funcional de la Proteína Eh-L10 de Entamoeba histolytica "

realizado por Luis Enrique Arias Romero

con número de cuenta 9010257-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Miguel Angel Vargas Mejía
Propietario	
Propietario	Dr. Ignacio Canacho Arroyo.
Propietario	M. en IBB. Laura del Carmen Vargas Parada.
Suplente	Biol. Christian Humberto Guerra Araiza.
Suplente	M. en C. Aliesha Araceli González Arenas.

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz



Dra. Edna María Suárez Díaz. DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio
2 del Departamento de Biomedicina
Molecular del Centro de Investigación y
Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional bajo la dirección del
Doctor Miguel Ángel Vargas Mejía.

Este trabajo quiero dedicarlo a las siguientes personas:

A mis padres y hermanos, ya que sin su apoyo este logro no hubiera sido posible. Gracias.

A mi tío Mario Arias por todos sus consejos, su tiempo y ayuda durante todos estos años.

A mi tía Silvia Romero. Gracias por todo.

A la familia Villamar Cruz, a la cuál agradezco su amistad.

A Olga y Fer por todo su cariño, tiempo y apoyo que espero seguir teniendo. Gracias.

Y en especial a todas aquellas personas que son perseguidas y acosadas por motivos políticos.

AGRADECIMIENTOS.

- Al Doctor Miguel Ángel Vargas Mejía por su confianza, su orientación académica y por inculcar en todos sus alumnos el gusto por la investigación.
- Al comité tutorial formado por el Doctor Miguel Ángel Vargas Mejía, el Doctor Ignacio Camacho Arroyo, la M. en IBB. Laura del Carmen Vargas Parada, el Biólogo Christian Humberto Guerra Araiza y la M. en C. Aliesha Araceli González Arenas por sus sugerencias para mejorar la presentación de este trabajo.
- A la M. en IBB. Laura del Carmen Vargas Parada por su amistad, ayuda, consejos, enseñanzas y sobre todo por fomentarme el gusto hacia los parásitos.
- A la Doctora Rosaura Hernández Rivas por sus amables comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo.
- A la Bióloga Ma. de Jesús Almaráz Barrera por su ayuda para realizar los experimentos de electroporación y por todos sus consejos.
- A todos los profesores de la Facultad de Ciencias que contribuyeron en mi formación académica.
- A todos mis amigos y compañeros de la UNAM y el CINVESTAV.
- A los pocos pero buenos camaradas que aún me quedan del C.C.H. Naucalpan.
- A todo el pueblo de México, ya que gracias a sus impuestos pude estudiar una carrera universitaria.

ÍNDICE.

Abreviaturas.....	i
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Objetivos.....	18
4. Materiales y Métodos	19
4.1. Cepas de bacterias y de <i>Entamoeba histolytica</i>	19
4.1.1. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	19
4.1.2. Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i>	19
4.2. Técnicas de Biología Molecular	19
4.2.1. Purificación de plásmidos.....	19
4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
4.2.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	21
4.2.4. Electroporación de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
4.2.5. Obtención de proteínas nucleares de <i>Entamoeba histolytica</i>	22
4.2.6. Marcaje radioactivo de la sonda AP 1.....	23
4.2.7. Obtención de proteínas totales de <i>Entamoeba histolytica</i>	24

4.3. Clonación del gen <i>eh-L10</i> en los vectores pExEhNeo, pSA8 y pProExHtc.....	24
4.3.1. Clonación del gen <i>eh-L10</i> en el vector de expresión amibiano pExEhNeo...	25
4.3.2. Clonación del gen <i>eh-L10</i> en el vector de expresión amibiano pSA8.....	26
4.3.3. Clonación del gen <i>eh-L10</i> en el vector de expresión procarionte pProExHtc	26
4.4. Expresión y purificación de la proteína recombinante Eh-L10.....	27
4.5. Análisis funcional de la proteína Eh-L10.....	28
4.5.1. Ensayos de retardo.....	28
4.5.2. Inmunodetección de la proteína Eh-L10 en las proteínas totales de las cepas electroporadas con los vectores pExEhNeo/ <i>eh-L10</i> y pSA8/ <i>eh-L10</i>	29
4.5.3. Localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa Eh-L10 ⁺⁺	30
5. Resultados	31
5.1. Clonación del gen <i>eh-L10</i> en los vectores pExEhNeo, pSA8 y pProExHtc.....	31
5.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante Eh-L10.....	36
5.3. Análisis funcional de la proteína Eh-L10.....	37
5.3.1. Expresión de la proteína Eh-L10 en las cepas Eh-L10 ⁺⁺ y Eh-L10 ⁻	37
5.3.2. Ensayos de retardo.....	39
5.3.3. Localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa Eh-L10 ⁺⁺	41
6. Discusión.....	43
7. Conclusiones.....	48
8. Perspectivas.....	49

9. Referencias.....	50
10. Apéndice.....	65

ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
µg	microgramos
µl	microlitros
BSA	Albumina sérica bovina
c.p.m.	cuentas por minuto
dNTP	desoxinucleótido trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraácetico
EGTA	Acido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter) -N,N,N,N- tetraácetico
g	gramo
HEPES	Acido N-2-hidroetilpiperazin-2-etanol sulfónico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
l	litro
mA	miliamperes
min	minuto
MOPS	Acido 3-(N-morfolinopranosulfónico)

mRNA	Acido ribonucleico mensajero
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina
Tween-20	polioxietilenesorbitan monolaureato

1. RESUMEN.

En este trabajo se realizó un estudio funcional de la proteína Eh-L10 de *E. histolytica*. Esta proteína fue reportada recientemente (Chávez-Ríos y Vargas-Mejía, 2000) y el análisis de su secuencia reveló una alta homología con las proteínas QM de humano, L10 de rata y Jif-1 de pollo. Hasta la fecha no se han reportado estudios sobre esta proteína en *E. histolytica*, sin embargo a sus homólogos en humano y pollo se les ha atribuido una probable función de reguladores negativos del factor de transcripción nuclear Jun (Monteclaro y Vogt, 1993). Al gen que codifica para esta proteína se le ha llamado *eh-L10*, tiene un tamaño de 651 pb, presenta un marco abierto de lectura de 217 aminoácidos y codifica para una proteína de 24 kDa. El gen *eh-L10* completo fue clonado en los vectores amibianos pExEhNeo (Hamann y col., 1995) y pSA8 (Ankri y col., 1998) con el objeto de obtener cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻ respectivamente; estas construcciones fueron empleadas para electroporar amibas de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS y determinar los niveles de expresión de esta proteína en ambas cepas.

Con el objeto de determinar si en *E. histolytica* existe un complejo de proteínas nucleares que reconozcan la secuencia consenso para el complejo AP-1 (TGACTCA) conocida como elemento de respuesta a TPA (TRE), se diseñaron oligonucleotidos que contuvieran la secuencia consenso para AP-1 y se montó la técnica para realizar ensayos de retardo; una vez que se comprobó la existencia de un complejo de proteínas nucleares de *E. histolytica* que reconoce específicamente esta secuencia se realizaron ensayos de competencia adicionando la proteína Eh-L10 purificada. Los resultados obtenidos confirman que al igual que QM y Jif-1, Eh-L10 desestabiliza la unión de un complejo hacia esta secuencia, lo que nos sugiere en primer lugar que probablemente exista un complejo semejante a AP-1 en *E. histolytica* y en segundo lugar que Eh-L10 pudiera ser un regulador negativo de la proliferación celular, ya que el complejo AP-1

participa activamente en la transcripción de genes involucrados en la transformación neoplásica, proliferación celular y apoptosis. Finalmente, la inmunofluorescencia contra Eh-L10 nos reveló que en la cepa sobreproductora esta proteína se encuentra presente de manera abundante en el núcleo celular.

2. INTRODUCCIÓN.

1. Biología de *Entamoeba histolytica*.

La amibiasis humana es producida por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*. Se estima que 500 millones de personas en el mundo están infectadas, de las cuales 40 millones han desarrollado lesiones primarias que pueden anteceder a abscesos extraintestinales. Cada año mueren 100 mil individuos a causa de este padecimiento, siendo esta la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias solo debajo de la malaria y la esquistosomiasis (W.H.O., 1995). *E. histolytica* es cosmopolita, aunque su infección es más frecuente en países con deficientes condiciones sanitarias como México, la India y otros países de América Latina, Asia y África.

En el año de 1994 se realizó en México el mayor estudio seroepidemiológico sobre la amibiasis que se haya efectuado hasta la fecha. Se analizaron sueros de 67 mil individuos de una muestra representativa de la población mexicana, tanto en regiones rurales como urbanas, y procedentes de distintos estratos socioeconómicos, encontrándose que el porcentaje total de seropositividad es del 8.41% (Caballero y col, 1994), lo que confirma que la amibiasis tiene una alta incidencia en México y no está asociada con condiciones climáticas particulares. La mayor frecuencia se encontró en niños con edades entre 5 y 9 años. En general, la amibiasis se asocia a condiciones sanitarias inadecuadas y bajos niveles educativos de la población afectada.

2.1. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (Fig.1) es relativamente simple comparado con el de otros protozoarios parásitos, normalmente habita y se multiplica en el intestino grueso del

hombre donde reside, ocasionalmente puede invadir la mucosa y el epitelio intestinal llegando a otros tejidos y difundiéndose preferentemente desde el intestino hacia el hígado, aunque también puede invadir pulmones, cerebro, piel y otros órganos. Desde este punto de vista los trofozoitos se asemejan en cuanto a su comportamiento invasivo y metastásico a las células cancerosas; este proceso podría estar regulado por cambios tanto en las células invasoras como en las células huésped (Leroy y col., 1995). Durante su ciclo de vida *E. histolytica* presenta dos estadios: la fase replicativa o trofozoito y la fase infectiva o quiste. El trofozoito se multiplica por un proceso de fisión binaria que se lleva a cabo en el intestino humano. Conforme los trofozoitos viajan a través del colon las condiciones son menos favorables, para protegerse y bajo la influencia de la flora bacteriana adecuada los trofozoitos se enquistan. Durante este proceso los trofozoitos se condensan en una masa esférica rodeándose con una gruesa pared, este estado es conocido como pre-quístico con un solo núcleo. Tanto quistes como algunos trofozoitos son expulsados del cuerpo en las heces fecales. Los trofozoitos no participan en la transmisión de la infección, ya que una vez que han abandonado el cuerpo son incapaces de enquistarse, por lo que los quistes liberados en las heces fecales son los responsables de la transmisión de la infección y pueden sobrevivir en las heces cuando menos 8 días a 20-34°C y durante 40 días a 2-6°C (Noble y Noble, 1976). Los quistes recién formados solo tienen un núcleo, al madurar el núcleo se divide por mitosis produciendo dos y luego cuatro núcleos, los cuales aunque de menor tamaño, tienen las mismas características que el núcleo del trofozoito (Smith y col., 1989).

Cuando un nuevo hospedero ingiere quistes maduros infectivos ya sea en alimentos o bebidas contaminadas, estos pasan a través del estómago y el intestino delgado hasta llegar cerca del colon ascendente donde se transforman nuevamente en trofozoitos. Los quistes tetranucleados producen ocho trofozoitos uninucleados al dividirse (Martínez-Palomo, 1989), los cuales posteriormente se dividen por fisión binaria, se adhieren a la mucosa intestinal y pueden residir

comensales o producir ulceración en la mucosa. En este momento puede ocurrir la invasión de los vasos sanguíneos con metástasis hacia varios órganos del cuerpo.

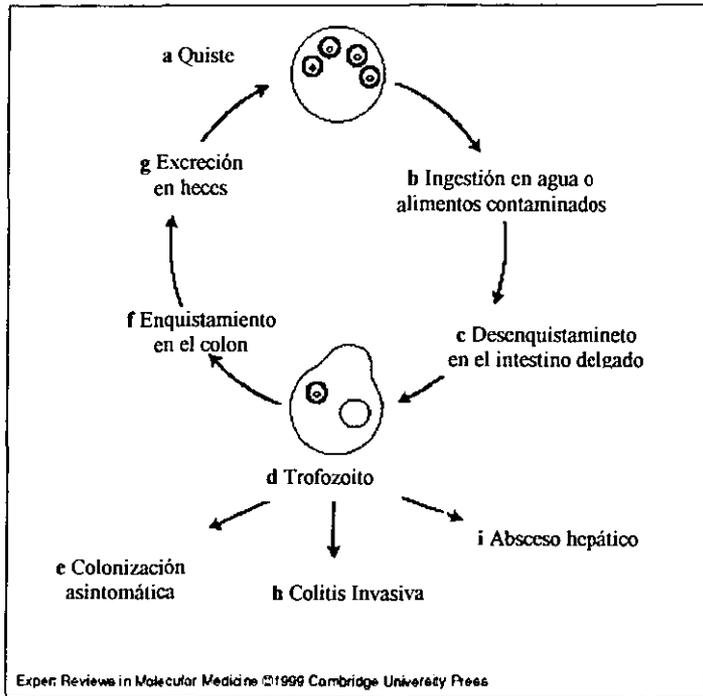


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*: La forma infectiva o quiste (a) es ingerido por el hospedero en agua o alimentos contaminados (b), pasa a través del aparato digestivo y desenquista en el intestino delgado; en este momento puede invadir otros órganos (i), causar colitis invasiva (h) o permanecer como un comensal (e); posteriormente viaja a través del intestino hasta llegar al colon donde vuelve a enquistarse (f) y es expulsado en las heces fecales (g). El ciclo de vida comienza nuevamente cuando otro individuo ingiere quistes infectivos. Tomado de Expert Reviews in Molecular Medicine. 1999 Cambridge University Press.

2.2. Morfología.

Entamoeba histolytica es un organismo estructuralmente simple, ya que el único organelo típicamente eucarionte que presenta es el núcleo; aunque estudios recientes han mostrado la existencia de estructuras semejantes al aparato de Golgi (Bakker-Grunwald y Wölstmann, 1993; Mazzuco y col., 1997), retículo endoplásmico (Mazzuco y col., 1997) y mitocondrias (Tovar y col., 1999; Mai y col., 1999). Los trofozoitos habitan las criptas del colon ascendente en la luz del intestino grueso del huésped, en donde se alimentan del moco y del contenido intestinal. El trofozoito es la forma móvil, mide de 10-60 μm y puede presentar una forma elongada o irregular, posee un núcleo redondo u ovalado característico con un cariosoma central y cromatina periférica en forma de gránulos finos (Martínez-Palomo, 1982). La cromatina de *E. histolytica* muestra una estructura típica de rosario, con nucleosomas de 10 nm de longitud (Brandt y Pérez-Tamayo, 1970). El trofozoito es esencialmente anaeróbico y su movimiento está basado en la formación de pseudópodos (Martínez-Palomo, 1989).

Los quistes son esféricos, con una fina pared de aproximadamente 125 a 150 nm de espesor, compuesta por una red de elementos fibrilares de 2 a 3 nm de diámetro. Este quiste contiene gránulos finos, cuerpos cromatoides y una distintiva masa difusa de glucógeno; su diámetro promedio es de 12.5 μm y contiene de uno a cuatro núcleos dependiendo de su grado de madurez. Este estadio constituye la fase de resistencia e infección del parásito y su presencia en heces se considera el diagnóstico más seguro de amibiasis intestinal.

2.3. Estructura genómica.

Hasta la fecha se conoce poco acerca de la organización genómica de *E. histolytica*, el tamaño aproximado de su genoma es de 4×10^8 pb, y tiene aproximadamente 38 000 genes. Los genes se encuentran en moléculas de forma circular y de tamaños muy variables (Lioutas y col, 1995), los genes ribosomales se encuentran en más de 200 moléculas extracromosomales y tienen una longitud de 25 kb. Estos plásmidos están constituidos por dos unidades transcripcionales de rRNA; cada una de estas unidades tiene un tamaño aproximado de 5.9 kb e incluye los genes 16S, 5.8S y 25S (Bhattacharya y col, 1989). Recientemente se han reportado genes que codifican para hemolisina dentro de estos plásmidos (Janson y col., 1994).

El mecanismo de división nuclear ha permanecido como uno de los aspectos biológicos menos comprendidos en la biología de este parásito. La división en *E. histolytica* se asemeja al proceso mitótico en células de eucariontes superiores, y se ha observado la existencia de cuatro fases que son semejantes a una profase, una anafase temprana, una anafase tardía y una telofase; aunque no se ha encontrado una etapa que asemeje una metafase (Orozco y col, 1988).

2.4. Virulencia.

Los trofozoítos de *E. histolytica* poseen una serie de moléculas que se encuentran directamente implicadas en la virulencia, la capacidad de invadir tejidos y la evasión del sistema inmunológico.

A partir de 1970, se han desarrollado una gran variedad de modelos tanto *in vivo* como *in vitro* para estudiar los efectos que tiene la amiba en las células epiteliales a las que se adhiere, denominado **efecto citopático** (Orozco y col., 1982; Martínez-Palomo y col., 1985; Mattern y col.,

1978); así como el efecto que tienen los extractos de la amiba sobre estas mismas células, denominado **efecto citotóxico** (Griffin y Juniper, 1971; Phillips, 1975).

Una de las proteínas que tiene un papel importante en el efecto citopático es el ameboporo. La familia de los ameboporos consta de tres miembros; llamados ameboporo A, ameboporo B y ameboporo C. Todas las isoformas del ameboporo son capaces de matar a su célula blanco, aunque el ameboporo C ha mostrado tener una mayor actividad citolítica que los ameboporos A y B. Los tres ameboporos parecen tener el mismo mecanismo de acción que consiste en la formación de poros sobre su célula blanco, que posteriormente muere debido a un choque osmótico (Leippe, 1997). Estos péptidos se encuentran localizados en los gránulos citoplásmicos de la amiba (Leippe y col., 1994a), su estructura tridimensional consta de cuatro α -hélices, teniendo la primera y la tercera una actividad formadora de poros (Leippe y col., 1994b).

En los estudios referentes al efecto citotóxico, se ha descrito el mecanismo de acción de algunas de las proteínas presentes en los extractos amibianos sobre las células epiteliales, entre las más importantes se pueden mencionar las **cistein-proteasas**. Estas proteasas tienen una función importante no solo en la invasión de las células del hospedero, si no que también son indispensables en el ciclo de vida del parásito. Un estudio reciente ha demostrado que estas proteasas son muy importantes para la sobrevivencia de los trofozoitos de *E. invadens*, y algunos inhibidores específicos de estas disminuyen significativamente su capacidad de enquistamiento (Sharma y col, 1996). El papel principal de las proteasas en la invasión de tejidos está basado en su habilidad de adherirse a la matriz extracelular, así como la de degradar algunas proteínas como la fibronectina, la laminina y la colagena tipo I (Que y Reed, 1997).

Uno de los mecanismos más importantes en el proceso de virulencia de *E. histolytica* es la adhesión a su célula blanco, entre los receptores que participan en este mecanismo se han reportado

una lectina de 220 kDa que reconoce células epiteliales (Rosales-Encina y col., 1987) una lectina de 170 kDa (Tannich y col., 1991) y una adhesina de 112 kDa que se une a eritrocitos y participa en su fagocitosis (Arroyo y Orozco, 1987). Por otra parte, se ha observado que a concentraciones milimolares de galactosa (Gal) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), puede inhibirse el proceso de adhesión de la amiba a su célula blanco, lo que sugiere que la superficie de los trofozoitos posee receptores para estas moléculas (Ravdin, 1989).

2.5. Tratamiento.

Los imidazoles son el grupo de fármacos más empleados en la actualidad contra la amibiasis. Este grupo de drogas incluye al metronidazol, nimorazol, seconidazol, cardinazol y ordinazol entre otros. De estos, el metronidazol es la droga amebicida más empleada, ya que a bajas concentraciones (1-2 µg/ml) es activa contra los trofozoitos de *E. histolytica* (Powell y col, 1966). El metronidazol es un nitroimidazol cuyo grupo nitro se reduce en el citoplasma del parásito a un producto final tóxico que parece ser un derivado hidroxiamino. Esta reducción mantiene un gradiente de concentración a través de la membrana celular y permite su acumulación intracelular (Ings y col, 1974). El metronidazol reducido se une covalentemente a los residuos de citosina y guanina del DNA provocando su rompimiento y la consiguiente pérdida de la estructura helicoidal, con lo que se destruye su capacidad de servir como templado para la síntesis de DNA y RNA (Knigh y col, 1978).

II. Probable interacción de las proteínas ribosomales QM/Jif-1 con el complejo transcripcional AP-1.

El objeto de este trabajo es realizar un estudio funcional de la proteína Eh-L10 de *Entamoeba histolytica*, esta tiene aproximadamente un 73% de homología con las proteínas QM de humano y L10 de ratón; y el análisis de su secuencia reveló que presenta los mismos dominios estructurales. Hasta la fecha no se han realizado estudios sobre la función de esta proteína, por lo que la descripción funcional como estructural se efectuará con base en los reportes previos sobre QM/Jif-1. Estudios realizados por varios investigadores sugieren que homólogos a esta proteína en humano y en pollo (llamados QM y Jif-1 respectivamente) tienen la propiedad de revertir de un fenotipo formador de tumor a uno no formador de tumor en una línea celular híbrida del nefroblastoma de Wilm's (Monteclaro y Vogt, 1993; Dowdy y col., 1991). Durante el desarrollo de este tipo de tumor se ha demostrado que un complejo proteico formado por miembros de las familias Jun y Fos interacciona con la secuencia de reconocimiento para el complejo AP-1 también conocida como elemento de respuesta a TPA (TRE) modificando el ciclo celular y la expresión de proto-oncogenes como *myc* y *fos*, al parecer QM/Jif-1 interacciona con Jun a través del zipper de leucinas impidiendo la formación del complejo dimérico y su posterior unión a TRE (Monteclaro y Vogt, 1993), por lo que esta proteína podría regular negativamente la proliferación celular mediada por *myc* y *fos*. La estructura y función de QM/Jif-1, así como la composición del complejo AP-1 será descrita más ampliamente a continuación.

2.6. QM y otras proteínas ribosomales con una función dual.

Existe evidencia de que algunas proteínas ribosomales tienen una segunda función (Wool, 1996), QM es una de estas moléculas que posee una función extraribosomal. El cDNA que codifica a QM en humano mide 753 pb y originalmente fue aislado por hibridación substractiva de una línea celular hibrida del tumor de Wilm's (Dowdy y col., 1991). QM es una proteína con un peso aproximado de 25 kDa que es rica en aminoácidos básicos y tiene un punto isoelectrico de 10.5 (Dowdy y col., 1991; Kaneko y col., 1992; Stanbridge y col., 1994). Los ensayos de Northern y Southern blot realizados hasta la fecha han mostrado que QM forma parte de una familia multigénica; el análisis de las secuencias de esta proteína en más de 10 especies eucariontes (Fig.2) entre las que se encuentran mamíferos, aves, plantas y levaduras han mostrado un alto grado de conservación, además de estar presente en todos los tejidos y etapas de desarrollo estudiados hasta la fecha (Farmer y col., 1994). La estructura de esta proteína sugiere la presencia de dos dominios básicos (del aminoácido 1 al 32 y del aminoácido 150 al 175); el primero de estos dominios contiene 10 aminoácidos básicos y es rico en prolinas, enseguida de este se encuentra una α -hélice del aminoácido 34 al 45. En el segundo de estos dominios se encuentran nueve residuos básicos que se encuentran conservados en todos los homólogos de QM a excepción del de levadura, y enseguida de este se encuentra una α -hélice del aminoácido 180 al 187 (Farmer y col., 1994). En la estructura secundaria de esta proteína también se puede observar un dominio ácido del aminoácido 54 al 72, un asa de glicinas que se encuentra aproximadamente a la mitad de la molécula, y que es flanqueada en ambos extremos por hojas β plegadas (Stanbridge y col., 1994).

QM es prácticamente idéntica a la proteína L10 de rata (Chan y col., 1996) y a la proteína Jif-1 (Jun interaction factor) de pollo (Monteclaro y Vogt, 1993). Jif-1 tiene la capacidad de

interaccionar con la oncoproteína Jun a través del zipper de leucina, inhibiendo así la formación del heterodímero Jun-Fos o del homodímero Jun-Jun y su posterior unión a la secuencia de reconocimiento para el complejo transcripcional AP-1 (Monteclaro y Vogt, 1993). QM/Jif-1 puede regular negativamente la activación de la transcripción mediada por AP-1, y al participar este complejo activamente en la transcripción de *c-myc* y *c-fos*, QM/Jif-1 pudieran tener un papel importante en el control de la proliferación celular.

Una serie de estudios en sistemas experimentales han indicado que QM es una proteína abundante en citoplasma, y un análisis por fraccionamiento subcelular sugiere que QM también se localiza en el retículo endoplasmico rugoso y esta asociada al ribosoma (Eisinger y col., 1997; Loftus y col., 1997).

Actualmente existen reportes de un gran número de proteínas ribosomales que tienen una función dual. Por ejemplo; la proteína S6 de *Drosophila melanogaster* (Watson y col., 1992) está involucrada en la regulación del desarrollo, ya que mutaciones en este gen causan la formación de tumores en la larva y en las moscas se desarrollan órganos hematopoiéticos hipertrofiados. En *Ascaris lumbricoides* su homóloga recibe el nombre de S19 y es requerida para la condensación de la cromatina durante la división celular (Etter y col. 1994). En humanos la proteína homóloga recibe el nombre de S4 y se ha observado que en pacientes con síndrome de Turner hay alteración en el mRNA de esta proteína causando insuficiencia gonadal y una gran variedad de anomalías anatómicas (Fisher, 1990). Otra proteína ribosomal que presenta una función dual es la S3 de humano que participa en la reparación del DNA teniendo actividad de endonucleasa III (Kim y col. 1995).

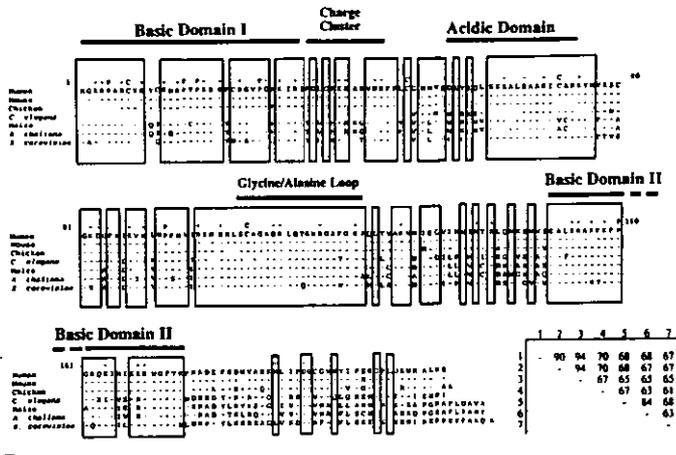


Figura 2. Alineamiento de las secuencias peptídicas de homólogos a QM. Las regiones altamente conservadas se encuentran marcadas en recuadro y los dominios importantes se encuentran detallados sobre la secuencia. La matriz de similitud muestra el porcentaje de identidad entre varias secuencias (1, humano; 2, ratón; 3, pollo; 4, *Caenorabditis elegans*; 5, maíz; 6, *Arabidopsis thaliana*; 7, *Saccharomyces cerevisiae*). Tomado de Stanbridge y col. 1994.

2.7. AP-1 y proteínas asociadas.

AP-1 es un complejo transcripcional aislado a partir de células HeLa (Lee y col., 1987), consiste en una mezcla de polipéptidos que tienen la propiedad de unirse a la secuencia de DNA TGACTCA (Ryseck y Bravo, 1991). AP-1 es un activador de la transcripción de diferentes genes (Fig. 3), entre los que se encuentran la metalotioneina IIA, la colagenasa, la estromelina y algunos otros que son mediadores en la transformación neoplásica (Matrisian, 1994), proliferación celular, diferenciación, desarrollo neuronal y apoptosis (Karin y col., 1997; Curran y Morgan, 1995). La

actividad de AP-1 en diferentes líneas celulares puede ser incrementada por ésteres de forbol como el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) (Angel y col. 1987).

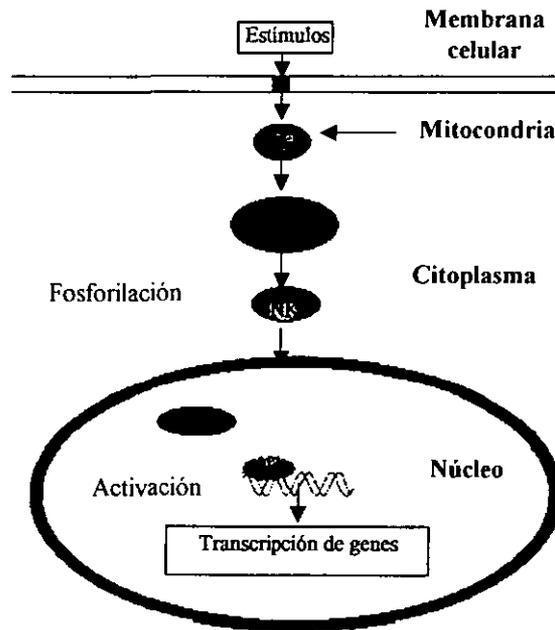


Figura 3. Modelo del mecanismo de activación de la transcripción de genes mediado por AP-1. Algunos estímulos tales como la luz UV, exposición a promotores tumorales, factores de crecimiento y oncogenes entre otros pueden promover la liberación de agentes oxidantes (ROS) por parte de la mitocondria y la fosforilación de la proteína cinasa N-terminal de Jun; lo que conlleva a la activación de AP-1, la unión a su región consenso y la transcripción de algunos genes.

La secuencia de reconocimiento del complejo AP-1 o elemento de respuesta a TPA (TRE) se encuentra contenida dentro de la secuencia blanco de la proteína Jun (ATGACTCAT) (Franza y col., 1988); *c-jun* (Fig. 4) es el homólogo celular del oncogen viral *v-jun* (Maki y col., 1987); en humanos la proteína codificada por este gen tiene un tamaño de 327 aminoácidos (Hattori y col.

1988), mientras que en ratón y pollo tienen un tamaño de 330 y 310 aminoácidos respectivamente (Ryseck y col., 1988; Nishimura y Vogt, 1988). Hasta la fecha se han descrito otras dos proteínas fisiológica y estructuralmente semejantes a Jun, a las cuales se les ha denominado Jun B y Jun D (Ryder y col., 1988; Hirai y col., 1989; Ryder y col., 1989), y se ha demostrado que estas proteínas se encuentran presentes en el núcleo celular (Bohman y col., 1987). En los primeros 122 aminoácidos del extremo amino terminal de Jun se encuentran tres regiones ácidas que son importantes para la activación transcripcional (Struhl, 1987), mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentran dos motivos importantes que intervienen en la unión de esta proteína al DNA. Entre los aminoácidos 252 y 280 hay una región altamente básica y rica en prolinas, mientras que entre los aminoácidos 280 y 308 se encuentra un zipper básico de leucinas (bZIP). Este es un dominio de α -hélice, en el que cuatro o cinco leucinas se encuentran separadas en intervalos regulares de siete aminoácidos (Rasmussen y col., 1991) y es fundamental para que se dé el proceso de dimerización, requisito indispensable para la unión de esta proteína al DNA (Vogt y Bos, 1990). Jun puede unirse a la secuencia de reconocimiento del complejo AP-1 formando dímeros consigo misma, con Jun B, Jun D o cualquier miembro de la familia Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 y Fra-2) (Angel y col., 1991), aunque la afinidad de estos complejos proteicos hacia el DNA puede diferir dependiendo de la forma como estén combinadas estas proteínas (Ryseck y Bravo, 1991). Hasta la fecha se ha comprobado que Jun tiene un papel importante en la regulación de la transcripción (Hay y Curran, 1991), además de participar activamente en el crecimiento, diferenciación y proliferación celular (de Groot y col., 1990; Johnson y col., 1993; Schreiber y col., 1999). La regulación de la transcripción por parte de esta proteína ha sido ampliamente estudiada, al parecer Jun es un integrador molecular de diferentes señales de transducción y su actividad es regulada por la fosforilación de los residuos de serina o treonina, que es provocada por una gran variedad de

estímulos entre los que se encuentran la exposición a promotores tumorales, factores de crecimiento, luz UV y oncogenes entre otros (Karin, 1995).

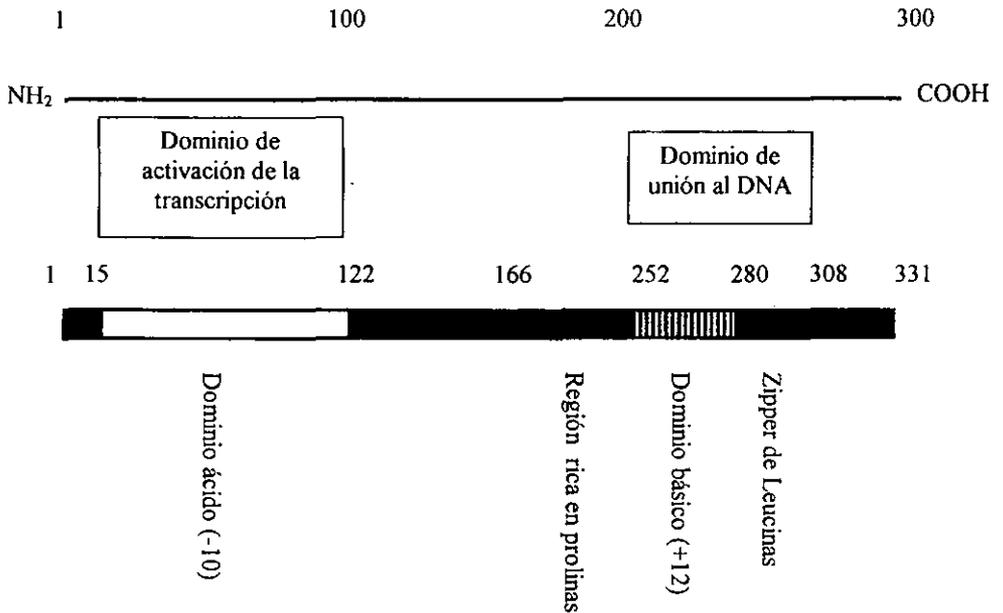


Figura 4. Representación esquemática de la oncoproteína Jun donde se muestran los principales dominios y motivos que la constituyen. Tomado de *Advances in Cancer Research*, 1990.

c-fos, por otra parte, es un homólogo celular de un oncogen presente en los virus de sarcomas murinos FBJ y FBR (Curran y col., 1983). La proteína codificada por este gen tiene una localización nuclear y en humanos un tamaño aproximado de 380 aminoácidos, en la secuencia de las proteínas de la familia Fos puede observarse un zipper básico de leucina (bZIP) entre los aminoácidos 163 y 195 (Franza y col., 1987). Por si mismas, las proteínas de esta familia no son capaces de unirse al DNA (Sassone-Corsi y col., 1988), ni tampoco pueden asociarse consigo mismas para formar dímeros; por lo que se requiere la

formación de un complejo con alguna proteína de la familia Jun para que las proteínas Fos sean activas (Distel y col., 1987).

2.8. Justificación.

La importancia del estudio de proto-oncogenes en *Entamoeba histolytica* radica en que esta presenta una gran capacidad de invasión a tejidos; por lo que se ha propuesto que este protozoario presenta un fenotipo similar al de las células transformadas (Orozco y col., 1994). La identificación de genes en *E. histolytica* con una alta homología a proto-oncogenes virales y celulares, es un aspecto muy interesante dentro de la biología de este parásito, ya que estos podrían estar participando activamente en la capacidad invasiva y metastásica de la amiba. Recientemente se aisló en nuestro laboratorio un gen con una alta homología a QM (de aproximadamente un 73%), al que se le ha denominado *eh-L10* (Chávez-Ríos y Vargas-Mejía, 2000), el estudio funcional de la proteína para la cual codifica este gen nos permitirá determinar su posible interacción con algunas proteínas nucleares de *E. histolytica*, así como alguna posible función extra-ribosomal.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Realizar un estudio funcional de la proteína Eh-L10 de *Entamoeba histolytica*.

Objetivos particulares:

- Generar cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻.
- Determinar los niveles de expresión de la proteína Eh-L10 en las cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻.
- Expresar y purificar la proteína recombinante Eh-L10 en el vector de expresión pProExHtc.
- Realizar ensayos de interacción DNA-proteína utilizando las proteínas nucleares de *E. histolytica* y la región de reconocimiento del complejo transcripcional AP-1.
- Realizar ensayos de competencia adicionando a los ensayos de retardo la proteína Eh-L10 purificada.
- Determinar la localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa Eh-L10⁺⁺ por medio de microscopía de fluorescencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas de bacterias y de *Entamoeba histolytica*.

4.1.1. Cultivo de *Escherichia coli*

Para las técnicas de clonación y expresión se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α . Las bacterias fueron mantenidas a -80°C en glicerol al 50% y cuando se necesitaron fueron descongeladas, sembradas en cajas de medio LB-agar e incubadas a 37°C durante toda una noche.

4.1.2. Cultivo de *Entamoeba histolytica*

La cepa patógena de *E. histolytica* HM1:IMSS fue cultivada axénicamente en medio de cultivo TYI-S-33 (Diamond, 1968) suplementado con 20% de suero de bovino adulto previamente inactivado con calor durante 30min a 60°C . Para todos los experimentos se utilizó un cultivo de amibas en fase logarítmica de crecimiento.

4.2. Técnicas de biología molecular

4.2.1. Purificación de plásmidos.

Para la purificación de grandes cantidades de plásmido se utilizó un estuche para maxiprep (Qiagen, USA) de acuerdo a la metodología sugerida por el proveedor. Las cantidades pequeñas de

plásmido fueron obtenidas de acuerdo a la metodología propuesta por Birnboim y Doly (1979). Bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α fueron inoculadas en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubadas durante toda una noche a 37°C con agitación. El cultivo se centrifugo a 6000 rpm durante 5 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 250 μl de solución 1 (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% glucosa); se adicionaron 500 μl de solución 2 (0.2 M NaOH, 1% SDS) y las bacterias fueron lisadas durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 500 μl de solución 3 fría (3 M acetato de sodio pH 5.2) y la mezcla se incubó durante 15 min en hielo. La mezcla se centrifugo durante 15 min a 14000 rpm y 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se precipitó añadiendo 3 volúmenes de etanol absoluto y un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.2 durante toda una noche a -20°C. El DNA se centrifugo durante 30 min a 14000 rpm, la pastilla se lavó dos veces con 200 μl de etanol al 70%, se resuspendió en 20 μl de agua estéril y se incubó durante 15 min a 37°C con RNasa a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación del gen *eh-L10* se utilizó como cadena molde 1 μg de DNA genómico de *E. histolytica* en un volumen de reacción de 100 μl . La mezcla estuvo compuesta por 100 μM de dNTP's, 100 pM de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (ver apéndice), 10 μl de buffer de reacción 10X (10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM de MgCl_2) agua estéril y 2.5 U de *Taq* polimerasa (Amersham). La concentración de los oligonucleótidos y su temperatura de alineamiento se calculó de acuerdo a las siguientes fórmulas:

- Concentración de los oligonucleótidos:

$$mM = [(DO)(100)] / \{ [(A+G)(14)] + [(T+C)(7)] \}$$

- Temperatura de alineamiento:

$$TM = [(A+T)(2)] + [(C+G)(4)] - 5$$

4.2.3. Transformación de *Escherichia coli*.

Una alícuota de 200 μ l de células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α se colocó en hielo, se le adicionó 1 μ g del plásmido de interés (ver apéndice) y se incubó a 4°C durante 30 min; posteriormente las bacterias fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 2 min, se les adicionaron 800 μ l de medio LB tibio y se incubaron a 37°C durante una hora. El cultivo fue transferido a un tubo eppendorf y centrifugado a 14000 rpm durante 1 min, las células fueron resuspendidas en 100 μ l de LB, y crecidas durante toda una noche a 37°C en cajas de LB-agar con ampicilina a una concentración final de 25 μ g/ml .

4.2.4. Electroporación de *Entamoeba histolytica*.

Una muestra de 1×10^6 trofozoítos se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min y la pastilla se lavó con 40 ml de PBS 1X pH 7.0; se aplicó un segundo lavado con 40 ml de Citomix incompleto (10 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 0.15 mM CaCl₂, 25 mM Hepes pH 7.6, 2 mM EGTA pH 7.6, 5 mM MgCl₂), y la pastilla se resuspendió en 500 μ l de Citomix completo (10 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6, 0.15 mM CaCl₂, 25 mM Hepes pH 7.6, 2 mM EGTA pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 5 mM Glutacion, 2 mM ATP); se adicionaron 200 μ g del vector pSA8/*eh-L10* o

del vector pExEhNeo/eh-L10 previamente obtenido por maxiprep y las amibas se electroporaron bajo las siguientes condiciones: 1200 mV, 25 μ F y un tiempo constante de 0.4 ms en un electroporador Gene Pulser II de BIO-RAD . Las amibas transfectadas fueron transferidas a una botella de con medio de cultivo TYI-S-33 completo (Diamond, 1968) suplementado con benzilpenicilina a una concentración de 50 μ g/ml y se mantuvieron a 37°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio a las amibas y se les adicionó desde 10 μ g/ml hasta 100 μ g/ml de geneticina (G-418) como agente selectivo.

4.2.5. Obtención de proteínas nucleares de *Entamoeba histolytica*.

Las proteínas nucleares se obtuvieron a partir de las clonas de *E. histolytica*, de acuerdo a la metodología propuesta por Schreiber (1989). Una muestra de aproximadamente 1×10^7 trofozoitos se centrifugó a 2000 rpm durante 5min a 4°C y la pastilla se lavó en PBS 1X pH 6.8, posteriormente se resuspendió en 4 volúmenes de buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) y se incubó por 20 min a 4°C. Los trofozoitos se centrifugaron en el rotor Sorvall GSA a 8600 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 5 volúmenes de buffer A suplementado con inhibidores de proteasas (0.5 mM PMSF, 2 mM benzamidina y 5 μ g/ml de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina, pepstatina A, leupeptina y E-64).

Los trofozoitos se rompieron con 30 golpes en un homogenizador Dounce; y la integridad de los núcleos se monitoreó por microscopía de contraste de fases. Los núcleos se lisaron incubándolos durante 40 min a 4°C en buffer C suplementado con inhibidores de proteasas (20 mM Hepes pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 mM

benzamidina y 5 µg/ml de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina, pepstatina A, leupeptina y E-64). Posteriormente los extractos nucleares se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min a 4°C; el sobrenadante fue alicuotado y se guardó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas nucleares se determinó por el método de Bradford (1976).

4.2.6. Marcaje radioactivo de la sonda AP 1.

Para realizar los ensayos de retardo, se diseñaron dos oligonucleótidos de cadena complementaria que contienen la secuencia de reconocimiento del complejo AP-1. A estos se les llamó AP 1-1 y RAP 1-1 (ver secuencia en el apéndice). Los oligonucleotidos fueron mezclados en cantidades equimolares y alineados incubándolos 5 min a 80°C dejándose enfriar a temperatura ambiente. Se tomaron 10 µl de las secuencias alineadas y se les añadió en el siguiente orden: 28.75 µl de agua estéril, 5 µl de buffer PNK 10X, 1.25 µl de enzima PNK y 5 µl de [γ -³²P]dATP; se incubaron a 37°C durante 60 min y se inactivó la enzima incubando la mezcla 10 min a 68°C. Posteriormente se adicionaron 40 µl de agua estéril, 240 µl de acetato de amonio 5 M y 750 µl de etanol al 80%, se mezcló y se incubó toda la noche a -20°C.

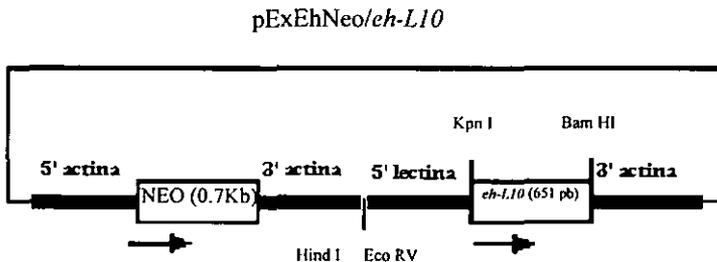
Los oligonucleótidos marcados fueron recuperados centrifugando la mezcla durante 20 min a 14000 rpm, el sobrenadante que contiene el ³²P no incorporado fue desechado y la pastilla fue lavada dos veces con 200 µl de etanol al 80%. La sonda marcada fue resuspendida en 100 µl de TE pH 7.6 y guardada en un envase de plomo a -20°C hasta su uso

4.2.7. Obtención de proteínas totales de *Entamoeba histolytica*.

La obtención de proteínas totales de las cepas electroporadas con los vectores pExEhNeo/*eh-L10* y pSA8/*eh-L10* cultivadas en medio TYI-S-33 en presencia de G-418 a concentraciones de 10 µg/ml y 100 µg/ml se realizó de acuerdo a la siguiente metodología: 1×10^6 células fueron lavadas una vez con 10 ml de solución salina estéril al 0.89%, el sobrenadante fue desechado y las células se resuspendieron en 50 µl de ácido p-mercuribenzoico 100 mM y 50 µl de N-etil maleimida 100 mM, se adicionaron 100 µl de buffer de carga para proteínas 2X y fueron incubadas a 95°C durante 5 min; posteriormente se les adicionaron 10 µl de β-mercaptoetanol y se incubaron durante 2 min a 95°C; la mezcla fue centrifugada, se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C hasta su uso.

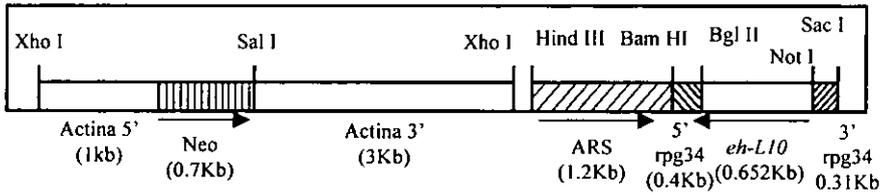
4.3. Clonación del gen *eh-L10* en los vectores pExEhNeo, pSA8 y pProExHtc.

Durante el desarrollo de este trabajo, se realizaron las siguientes construcciones:



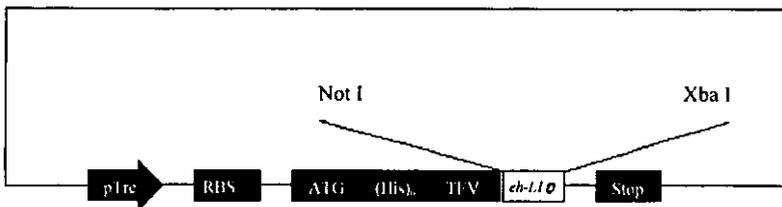
El gen *eh-L10* completo fue clonado en el vector pExEhNeo (Hamann y col., 1995) en los sitios Kpn I y Bam HI, quedando flanqueado hacia su extremo 5' por la región UTR del gen de lectina de la propia amiba y hacia su extremo 3' por la secuencia terminadora para el gen de actina de *E. histolytica*.

pSA8/*eh-L10*



El gen *eh-L10* completo fue clonado en el vector pSA8 (Ankri y col., 1998) en los sitios Bgl II y Not I, quedando flanqueado hacia sus extremos 5' y 3' por las regiones UTR del gen que codifica para la proteína ribosomal L21 de *E. histolytica* denominadas rpg34.

pProExHtc/*eh-L10*



El gen *eh-L10* se clonó en el vector de expresión procarionte pProExHtc en los sitios Not I y Xba I con el objeto de obtener una proteína pura que nos sirviera para realizar los estudios funcionales *in vitro*.

Las características particulares de cada uno de los vectores son descritas en el apéndice.

4.3.1. Clonación del gen *eh-L10* en el vector de expresión amibiano pExEh-Neo.

El inserto *eh-L10* liberado por doble digestión del vector pBluescript/*eh-L10* con las enzimas Kpn I y Bam HI fue purificado por Jet-Sorb (GENOMED) y ligado directamente en el vector de expresión pExEh-Neo (Hamann y col., 1995) previamente cortado con las mismas enzimas. Esta construcción se usó posteriormente para transformar células competentes *E. coli* de la cepa DH5- α que fueron crecidas en cajas de LB-ampicilina [25 μ g/ml] y las colonias positivas se seleccionaron por medio de una PCR sobre colonia.

4.3.2. Clonación del gen *eh-L10* en el vector pSA8.

Con el objeto de generar una cepa Eh-L10⁻ que nos permita observar el efecto del abatimiento en la expresión del gen *eh-L10*, se realizó una reacción de PCR sobre 1 μ g de DNA genómico de *E. histolytica* con 35 ciclos de amplificación y una temperatura de alineamiento de 55°C utilizando los oligonucleotidos Bgl II Eh-L10 y Not I Eh-L10 (ver apéndice). El producto amplificado fue purificado por columna y ligado al vector pCR 2.1; que posteriormente fue empleado para transformar células competentes de *E. coli* de la cepa DH5 α que fueron crecidas sobre cajas de medio LB-ampicilina a las que se añadió X-Gal e IPTG. Se realizó una reacción de PCR sobre las colonias candidatas a contener el gen *eh-L10*, una de ellas fue seleccionada para recuperar el plásmido y liberar un inserto de aproximadamente 670 pb con las enzimas Bgl II y Not I. El inserto *eh-L10* fue ligado en el vector pSA8, que ha sido utilizado con éxito para inhibir la expresión de genes por medio de antisentidos (Ankri y col., 1998). Esta construcción se usó posteriormente para transformar células competentes *E. coli* de la cepa DH5- α , que fueron crecidas

en cajas de LB-ampicilina [25 µg/ml] y las colonias positivas se seleccionaron por medio de una PCR sobre colonia.

4.3.3. Clonación del gen *eh-L10* en el vector de expresión procarionte pProExHtc.

Con la finalidad de expresar la proteína Eh-L10 de manera recombinante y analizar su posible interacción con proteínas nucleares de *E. histolytica*, el gen *eh-L10* fue amplificado mediante una reacción de PCR sobre 1 µg de DNA genómico con 35 ciclos de amplificación y una temperatura de alineamiento de 57°C utilizando los oligonucleotidos Not I Eh-L10 y Xba I Eh-L10 Rev (ver apéndice), el fragmento de aproximadamente 670 pb se ligó en el vector pProExHtc previamente digerido con las mismas enzimas. Esta construcción se usó posteriormente para transformar células competentes *E. coli* de la cepa DH5-α, que fueron crecidas en cajas de LB-ampicilina a una concentración de 25 µg/ml y las colonias positivas se seleccionaron por medio de una PCR sobre colonia.

4.4. Expresión y purificación de la proteína recombinante Eh-L10.

Para expresar la proteína recombinante, se dejó durante toda una noche a 37°C y con agitación constante un cultivo de la cepa de *E. coli* DH5-α que contiene el plásmido pProExHtc/*eh-L10* en 20 ml de 2YT-ampicilina a una concentración final de 25 µg/ml. Al día siguiente, se colocó una dilución 1:100 del cultivo en 250 ml de 2YT-ampicilina a una concentración final de 25 µg/ml y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 600 nm entre 0.5 y 1.0; posteriormente se adicionaron 1.25 ml de IPTG 100 mM, se incubó 5 horas a 37°C con

agitación y se centrifugó durante 10 min a 8000 rpm y 4°C en un rotor Sorvall GSA. La pastilla se dividió para ser purificada por dos métodos distintos. Para la purificación por el método soluble, la pastilla se resuspendió en 20 ml de buffer de sonicado (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0) mientras que para la purificación por el método insoluble la pastilla se resuspendió en 20 ml de buffer de sonicado con sarcosil al 10%. Ambas muestras se incubaron en hielo durante 15 min.

Las bacterias se sonicaron a una amplitud de 40-45 watts durante un minuto con intervalos de 10 seg, una vez que la lisis celular fue completa se centrifugó el lisado a 12000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga eppendorf y se recuperó el sobrenadante que fue incubado con 1 ml de resina TALON (Clontech Laboratories, USA) durante toda la noche con rotación a 4°C. Al día siguiente, la resina se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y la resina se lavó cinco veces con 15 ml de buffer de lavado (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol), se les adicionaron 400 µl de buffer de muestra para proteínas 2X, se transfirieron a un tubo eppendorf y se incubaron durante 5 min a 97°C. La resina fue centrifugada y el sobrenadante se analizó en un gel de poliacrilamida al 12%, las bandas de la proteína recombinante se cortaron, la proteína se purificó por electroelución y se concentró en columnas de Centricon (Millipore, USA), posteriormente la proteína se dializó durante 4 horas contra 500 ml de agua estéril y 48 horas contra buffer de unión DNA-proteína (12 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 4 mM Tris HCl pH 7.9, 1 mM espermidina, 1 mM MgCl₂) para finalmente ser analizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%.

4.5. Análisis funcional de la proteína Eh-L10.

4.5.1. Ensayos de retardo.

Para realizar estos ensayos, se siguió la metodología propuesta por Latchman (1995) con algunas modificaciones. Brevemente, diferentes concentraciones de las proteínas nucleares de *E. histolytica* (1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg y 20 µg) se incubaron durante 10 min a 4°C con 2 µl de buffer de unión DNA-proteína (12 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 4 mM Tris HCl pH 7.9, 1 mM espermidina, 1 mM MgCl₂), 1 µg de poli[d(I•C)] (Pharmacia Biotech. Inc.) 5 µl de la sonda AP 1 marcada con [γ -³²P]dATP y agua estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6% en TBE 0.5X (44.5 mM Tris HCl pH 7.9, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) a 20 mA, 200 V de 2-3 horas y fueron reveladas en una placa fotográfica (Kodak). Los ensayos de competencia se desarrollaron incubando 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 µg, 2 µg y 5 µg de la proteína Eh-L10 junto con 5 µg de los extractos nucleares, buffer de unión, agua estéril y la sonda marcada; y fueron analizados en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6% en TBE 0.5X (44.5 mM Tris HCl pH 7.9, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) con las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

4.5.2. Inmunodetección de la proteína Eh-L10 en las proteínas totales de las amibas electroporadas con los vectores pExEhNeo/eh-L10 y pSA8/eh-L10.

Las proteínas totales de *Entamoeba histolytica* fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) de acuerdo a la siguiente metodología: se utilizaron cuatro hojas de papel Whatman y una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel previamente humedecidas en buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris, 0.1% metanol), hacia el cátodo de la cámara de transferencia se colocaron en orden: 2 hojas de papel Whatman, la membrana de nitrocelulosa, el gel y 2 hojas más de papel Whatman, la transferencia se realizó durante 2 horas a 120 V. Posteriormente la membrana fue bloqueada con PBS-tween 20 y leche al 5% durante 8 horas a 4°C e incubada con anticuerpos policlonales anti-Eh-L10 obtenidos a partir de ratones hembra de la cepa Balb/c en una dilución 1:1000 durante toda una noche a 4°C; la membrana se lavó en PBS 1X y se incubó en PBS-tween 20 y leche al 5% con un segundo anticuerpo (anti-IgG) acoplado a peroxidasa en una dilución 1:5000 durante 4 horas a 37°C, se lavó 5 veces con PBS 1X y finalmente se reveló con H₂O₂ (Sigma) y 4-cloronaftol (Sigma).

4.5.3. Localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa Eh-L10⁺⁺.

Para determinar la localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa sobreproductora, una muestra de aproximadamente 2×10^6 amibas fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, la pastilla fue lavada con PBS 1X a 37°C y transferida a un tubo eppendorf, se adicionó 1 ml de paraformaldehído al 3.7% a 37°C y se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente las amibas fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 4 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue

resuspendida en 1 ml de PBS-Triton X-100 al 0.1%; se mezcló y se centrifugó la muestra inmediatamente a 2000 rpm durante 4 min, se eliminó nuevamente el sobrenadante, se adicionó 1 ml de NH_4Cl 50 mM a 37°C y se incubó la muestra durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra fue centrifugada por 2 min a 7000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 μl de anticuerpo anti-Eh-L10 diluido 1:50 en PBS-BSA 1% incubando toda la noche a 37°C. Al día siguiente, la muestra fue lavada 4 veces con PBS-BSA 1% a 37°C centrifugada 2 min a 7000 rpm entre cada lavado; y se incubó con 100 μl del segundo anticuerpo acoplado a FITC diluido 1:300 en PBS-BSA 1% y yoduro de propidio diluido 1:200 en PBS-BSA 1% a 37°C durante 2 horas. Posteriormente la muestra fue lavada 4 veces con PBS-BSA 1% a 37°C y resuspendida en 50 μl de Vectashield (Vector, USA) con el objeto de evitar una rápida pérdida de la fluorescencia durante su examinación, para finalmente ser montada en un porta objetos y observada en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60.

5. RESULTADOS

5.1. Clonación del gen *eh-L10* en los vectores pExEhNeo, pSA8 y pProExHtc.

Para la obtención de la cepa sobreproductora, un fragmento de aproximadamente 650 pb que corresponde al gen completo *eh-L10* fue liberado del vector pBluescript/*eh-L10* previamente obtenido por miniprep con las enzimas de restricción Kpn I y Bam HI (Fig. 5), este fragmento se ligó directamente en el vector de expresión amibiano pExEhNeo previamente cortado con las mismas enzimas y esta construcción fue utilizada para transformar células competentes *E. coli* de la cepa DH5 α . Las clonas candidatas a contener el gen *eh-L10* fueron seleccionadas por medio de una reacción de PCR sobre colonia (Fig. 6).



Figura 5. Liberación del fragmento *eh-L10* del vector pBluescript con las enzimas de restricción Kpn I y Bam HI. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder (Gibco), en el 2 aproximadamente 2 μ g del vector pBluescript/*eh-L10* y de los carriles 3-6 el inserto *eh-L10* purificado a partir de distintas clonas.

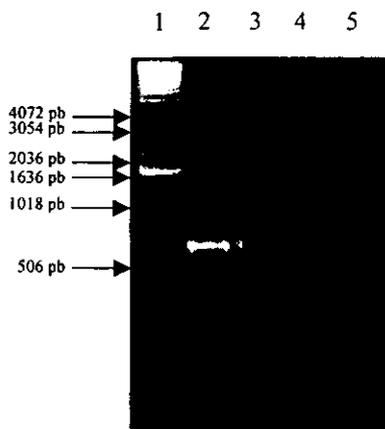


Figura 6. Reacción de PCR sobre las colonias candidatas a contener el vector pExEhNeo con el gen *eh-L10*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular y de los carriles 2-5 las clonas positivas (C1-C4 respectivamente).

Para la obtención de la cepa Eh-L10⁺ se realizó una reacción de PCR sobre 1 µg de DNA genómico de *E. histolytica* (Fig. 7), se amplificó un producto de aproximadamente 670 pb correspondiente al gen *eh-L10* que se ligó en el vector pCR 2.1 y posteriormente esta clonación fue usada para transformar células competentes *E. coli* DH5α; las clonas positivas fueron seleccionadas por medio de una PCR sobre colonia (Fig. 8). La colonia número 1 (C1) fue seleccionada para recuperar el plásmido y extraer el inserto por medio de una doble digestión con las enzimas Bgl II y Not I; este fragmento fue purificado (Fig. 9) y ligado en el vector pSA8 previamente cortado con las mismas enzimas. Las clonas positivas fueron seleccionadas por medio de una PCR sobre colonia (Fig. 10).

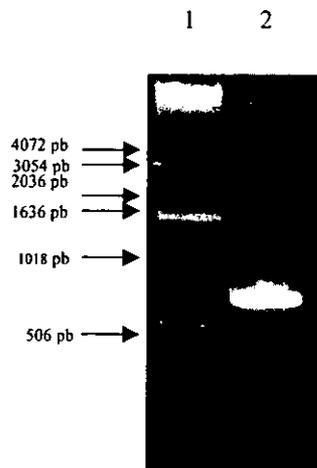


Figura 7. Amplificación por PCR del gen *eh-L10* utilizando oligonucleotidos que contienen sitios de restricción para las enzimas Bgl II y Not I. En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular y en el 2 se cargaron 3 µl de la reacción en un gel de agarosa al 0.8%.

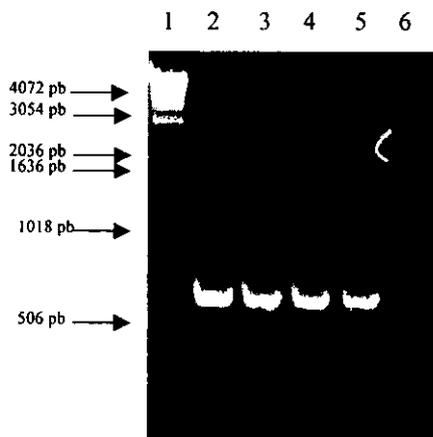


Figura 8. Reacción de PCR sobre las colonias candidatas a contener el vector pCR 2.1/*eh-L10*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular y de los carriles 2-6 las clonas positivas (C1-C5).

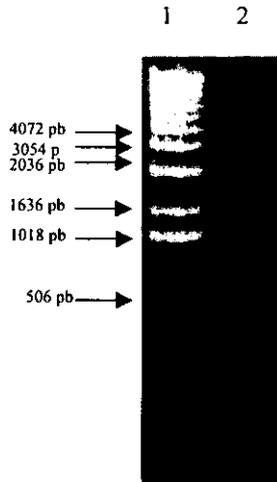


Figura 9. Purificación del gen *eh-L10* liberado del vector pCR 2.1/*eh-L10* por doble digestión con las enzimas Bgl II y Not I. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular y en el 2 aproximadamente 100 ng del inserto purificado.

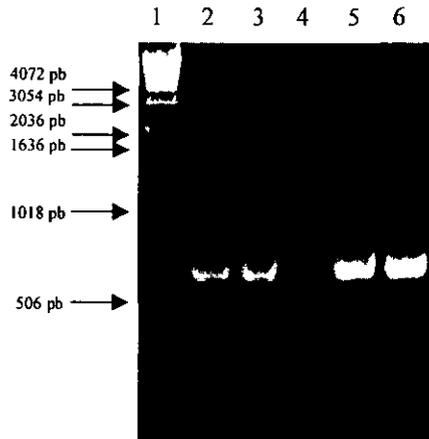


Figura 10. Reacción de PCR sobre las colonias candidatas a contener el vector pSA8/*eh-L10*. En el carril 1: marcador de peso molecular, de los carriles 2-6 se observan 4 clonas positivas (C1, C2, C3 y C4 en los carriles 2, 3, 5 y 6 respectivamente).

Para la clonación del gen *eh-L10* en el vector pProExHtc, se realizó una reacción de PCR sobre 1 µg de DNA genómico de *E. histolytica* utilizando oligonucleotidos específicos con sitios de restricción para las enzimas Hind III y Xba I (Fig. 11). El producto obtenido y que corresponde al gen *eh-L10* completo fue purificado y ligado directamente en el vector pProExHtc previamente cortado con las mismas enzimas; esta construcción fue utilizada para transformar células competentes *E. coli* de la cepa DH5α y las clonas candidatas a contener el gen fueron seleccionadas por una reacción de PCR sobre colonia (Fig. 12).

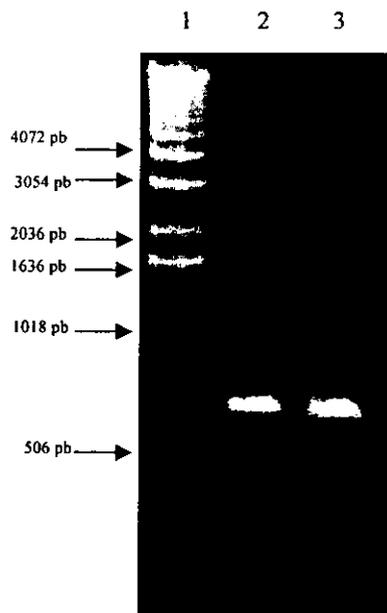


Figura 11. Reacción de PCR sobre DNA genómico de *E. histolytica*. En el carril 1: marcador de peso molecular y en los carriles 2-3 se cargaron 3 µl de la reacción.

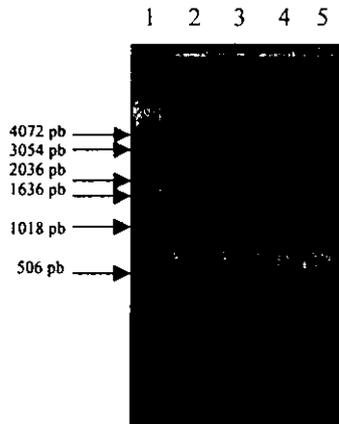


Figura 12. Reacción de PCR sobre las colonias candidatas a contener el vector pProExHtc/*eh-L10*. En el carril 1: marcador de peso molecular, de los carriles 2-5 se observan las clonas positivas (C1-C4).

5.2. Expresión y purificación de la proteína recombinante Eh-L10.

La proteína recombinante Eh-L10 se expresó y purificó mediante la metodología descrita anteriormente y su patrón electroforético fue obtenido en un gel de poliacrilamida al 12%. En la figura 13 se presenta el proceso completo de expresión y purificación de esta proteína a partir de la cepa DH5 α que contiene el vector de expresión procarionte pProExHtc/*eh-L10* y como controles se utilizaron bacterias de la misma cepa transformadas con el vector pProExHtc sin el gen que codifica para la proteína Eh-L10.

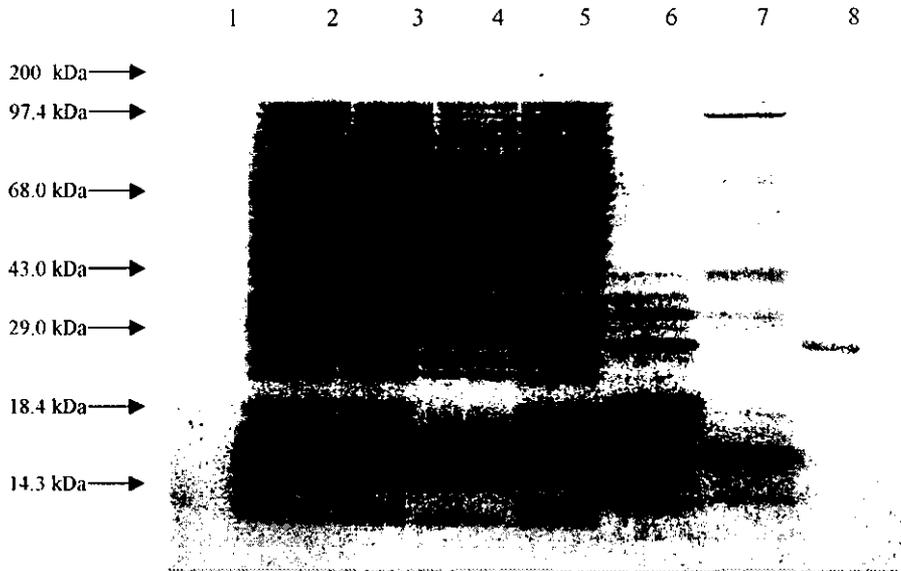


Figura 13. Proceso de expresión y purificación de la proteína recombinante Eh-L10. En el carril 1 marcador de peso molecular; carriles 2 y 3 proteínas totales de la cepa transformada con el vector pProExHtc sin inducir e inducida respectivamente; carriles 4 y 5 proteínas totales de la cepa transformada con el vector pProExHtc/*eh-L10* sin inducir e inducida; carril 6 purificación por método soluble; carril 7 purificación por método insoluble y carril 8 la proteína Eh-L10 electroeluida y concentrada.

5.3. Análisis Funcional de la proteína Eh-L10

5.3.1. Expresión de la proteína Eh-L10 en las cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻

Para determinar las diferencias en la expresión de la proteína Eh-L10 tanto en las cepas sobreproductoras como en las cepas menos crecidas en medio con G-418 a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$, se separaron las proteínas totales de estas en un gel de poliacrilamida al 12% utilizando como controles las proteínas totales de las cepas electroporadas con los vectores pSA8 y

pExEhNeo crecidas en medio con G-418 a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.14), esto con el objeto de mostrar que las proteínas no se encuentran degradadas y se utiliza la misma concentración en todos los casos; este gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se le realizó un Western blot utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína Eh-L10, en la figura 15 se observa que ambos controles presentan un nivel basal de expresión, mientras que en la cepa sobreproductora la expresión de la proteína aumenta conforme se incrementa la cantidad de agente selectivo en el medio en el cual se cultivo y en la cepa menos la expresión disminuye al aumentar la cantidad de droga en el medio.

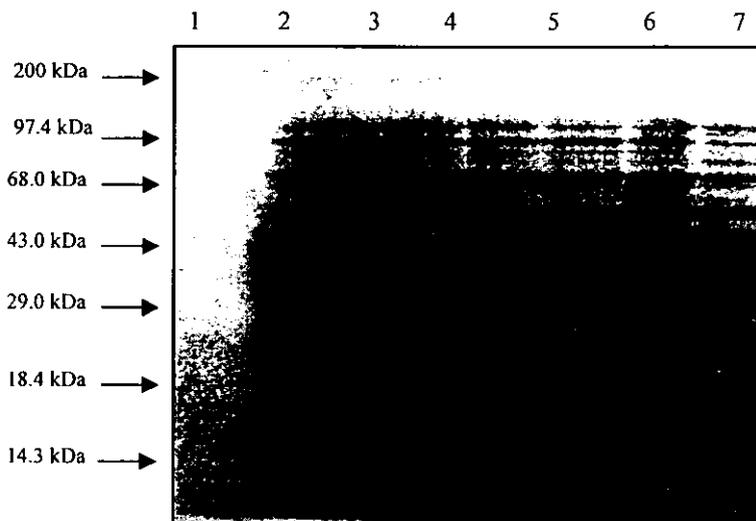


Figura 14. Proteínas totales de las cepas sobreproductoras y cepas menos para Eh-L10 de *Entamoeba histolytica*. En el carril 1 marcador de peso molecular; en el 2 las proteínas de la cepa electroporada con el vector pExEhNeo crecida a una concentración 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418; en los carriles 3 y 4 las proteínas de las amibas electroporadas con el vector pExEhNeo/eh-L10 crecidas a 100 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 respectivamente; en los carriles 5 y 6 las proteínas de las amibas electroporadas con el vector pSA8/eh-L10 crecidas a 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 y en el carril 7 las proteínas de las amibas electroporadas con el vector pSA8 crecidas a 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418.

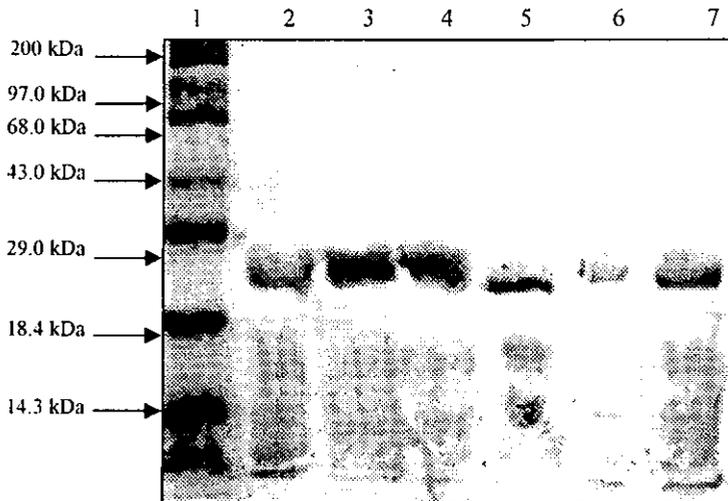


Figura 15. Inmunodetección de la proteína Eh-L10 en las cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular; en el 2 las proteínas totales de la cepa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS electroporadas con el vector pExEhNeo crecidas a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 como control; en los carriles 3 y 4 las proteínas totales de amibas electroporadas con el vector pExEhNeo/*eh-L10* crecidas a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 respectivamente; en los carriles 5 y 6 las proteínas totales de amibas electroporadas con el vector pSA8/*eh-L10* a concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 y en el carril 7 las proteínas totales de amibas electroporadas con el vector pSA8 crecidas a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 como un segundo control.

5.3.2. Ensayos de retardo.

Con el objeto de determinar si existe una interacción real entre la región consenso del complejo transcripcional AP-1 y las proteínas nucleares de *E. histolytica* se realizaron los ensayos de retardo tal y como se describió anteriormente. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 16; donde se puede observar que al incrementar la cantidad de proteínas nucleares, un complejo de estas se une a la secuencia consenso del complejo AP-1.

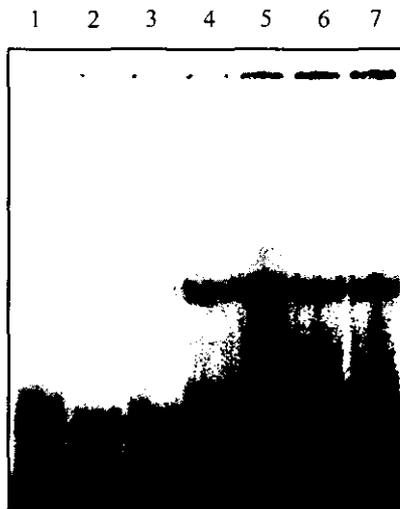


Figura 16. Ensayo de retardo entre las proteínas nucleares de la amiba y la sonda que contiene la secuencia consenso para el complejo AP-1. En el carril 1 la sonda libre, de los carriles 2-7 la sonda más 1 μg , 2 μg , 5 μg , 10 μg , 15 μg y 20 μg de proteínas nucleares de *Entamoeba histolytica* respectivamente.

Los ensayos de competencia se desarrollaron de manera similar, en estos se utilizaron 5 μg de proteína nuclear de *E. histolytica* por pozo, la sonda marcada y se adicionaron cantidades crecientes de la proteína Eh-L10 purificada (Fig. 17). Las cantidades de proteína recombinante usadas para las competencias fueron de 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 μg , 2 μg , y 5 μg ; y se observa que conforme aumenta la concentración de proteína recombinante se inhibe la unión de las proteínas nucleares de la amiba a la región consenso del complejo transcripcional AP-1, llegando a una inhibición total en la unión del complejo con 2 μg de la proteína Eh-L10 purificada. Para descartar la posibilidad de que la competencia sea inespecífica, se realizaron ensayos de competencia con una proteína no relacionada a este sistema; en este caso se utilizó albúmina sérica bovina en las mismas concentraciones en las que se empleó Eh-L10 y no se observó inhibición en la unión del complejo de proteínas nucleares hacia la sonda AP-1 (no mostrado).

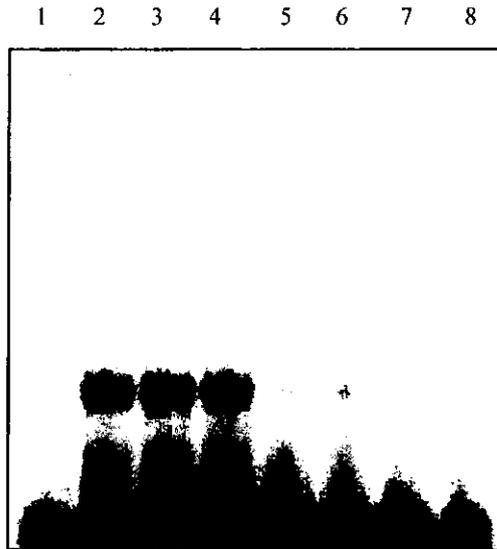


Figura 17. Ensayos de competencia entre las proteínas nucleares de *Entamoeba histolytica* y la proteína recombinante Eh-L10. En el carril 1 se cargo la sonda libre y en los carriles 2-8 se cargó la sonda más 5 μg de proteínas nucleares y 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1 μg , 2 μg y 5 μg de la proteína Eh-L10 respectivamente.

5.3.3. Localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa Eh-L10⁺⁺

La localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa sobreproductora, fue determinada por medio de microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra esta proteína obtenidos de ratones hembra de la cepa Balb/c, y los resultados muestran que Eh-L10 está presente de manera abundante en el citoplasma y da señal positiva en el núcleo celular (Fig. 18); lo cual concuerda con por lo menos dos reportes previos (Eisinger y col., 1997; Imafuku y col., 1999).

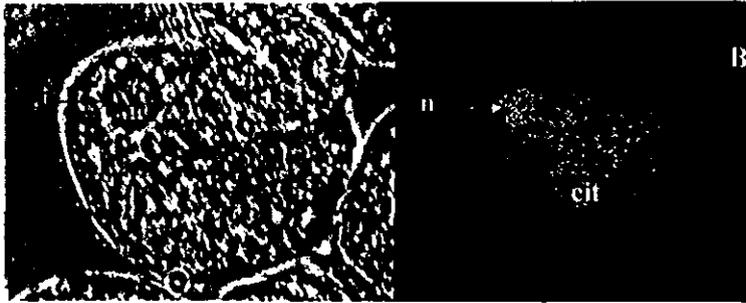


Figura 17. Inmunofluorescencia contra la proteína Eh-L10. En (A) se muestra el trofozoito de *Entamoeba histolytica* a 100X en contraste de fases; y en (B) incubado con anticuerpos α -Eh-L10 (1:50) y con un segundo anticuerpo acoplado a FITC. (n) corresponde al núcleo celular y (cit) al citoplasma.

6. DISCUSIÓN

QM/Jif-1 es una proteína altamente conservada en una gran cantidad de organismos eucariontes de distintos reinos (Farmer y col., 1994). Esta proteína ha mostrado ser esencial en levaduras ya que su homóloga en *Saccharomyces cerevisiae* denominada QSR1 es requerida para el ensamblaje de las subunidades ribosomales 40S y 60S (Eisinger y col., 1997) y su delección resulta ser letal (Tron y col., 1995). A pesar de la aparente importancia de QM/Jif-1 existe poca evidencia que indique cuál es su función en la célula, aunque estudios recientes la reportan como un probable supresor tumoral que regula negativamente a la oncoproteína c-Jun (Monteclaro y Vogt, 1993). Este no sería el primer caso de una proteína ribosomal que presenta una función dual; ya que por ejemplo, la proteína S6 de *Drosophila melanogaster* (Watson y col., 1992) está involucrada en la regulación del desarrollo, S19 que es su homóloga en *Ascaris lumbricoides* (Etter y col. 1994) es requerida para la condensación de la cromatina durante la división celular, mientras que alteraciones en el mRNA de la proteína S4 de humano (Fisher, 1990) causan insuficiencia gonadal y una gran variedad de anomalías anatómicas en pacientes con síndrome de Turner. En este trabajo se obtuvieron cepas menos y sobreproductoras para la proteína homóloga a QM en *Entamoeba histolytica* denominada Eh-L10 (Chávez-Ríos y Vargas-Mejía, 2000) por medio de electroporación, a las cuales se llamó Eh-L10⁻ y Eh-L10⁺⁺ respectivamente; además de determinar la localización celular de Eh-L10 y su probable interacción con algunas proteínas nucleares de la propia amiba.

Para la obtención de las cepas de *E. histolytica* Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻, amibas de la cepa HM1:IMSS fueron transfectadas con los vectores pExEhNeo/*eh-L10* y pSA8/*eh-L10* por medio de electroporación, ya que esta técnica ha demostrado ser eficiente tanto para la expresión transitoria de genes (Nickel y Tannich, 1994) como para la inhibición en la expresión de genes por medio de

antisentidos (Ankri y col., 1998; Ankri y col., 1999; Alon y col., 1997). Las amibas electroporadas con los vectores en los que se clonó el gen *eh-L10* en sentido así como en antisentido fueron crecidas a diferentes concentraciones de G418 (10 µg/ml y 100 µg/ml) ya que el número de copias del plásmido así como la cantidad de mRNA del gen clonado en el vector son proporcionales al nivel de resistencia del cultivo a esta droga (Hamann y col., 1995). Las amibas electroporadas con ambos vectores resultaron viables, para determinar el nivel de expresión de la proteína Eh-L10 se obtuvieron las proteínas totales de las cepas Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻, estas fueron analizadas por medio de un Western blot y los controles empleados muestran un nivel basal de expresión de esta proteína. En la cepa Eh-L10⁺⁺ se pudo observar un incremento considerable en su nivel de expresión mientras que en la cepa Eh-L10⁻ una disminución en su síntesis. Estos resultados son preliminares y no nos permiten determinar cuál es el efecto que tiene la inhibición y la sobre expresión de esta proteína en la amiba, ya que los trofozoitos tanto de las cepas Eh-L10⁺⁺ como Eh-L10⁻ no presentan diferencias morfológicas con respecto a la cepa silvestre. Algunos autores han propuesto que cuando no se observan cambios fenotípicos en un organismo al deletar una proteína hay una compensación funcional por parte de otras proteínas (Bray y Vasiliev, 1989; Gerisch y col., 1989). Para el caso de la ABP-120 de *Dyctiostelium discoideum* se ha demostrado que esto no sucede (Cox y col., 1996). En lo que respecta a la cepa Eh-L10⁻ no se logró una inhibición total en la expresión de la proteína para poder determinar si la ausencia de esta tiene el mismo efecto que en levaduras; lo anterior probablemente se debió a que no se llevó el cultivo a una mayor concentración de G418, aunque lo ideal sería contar con un organismo knock out ya que aportaría mayor información sobre la importancia de la presencia de esta proteína para la viabilidad de la amiba.

Los estudios de inmunofluorescencia realizados en este trabajo para determinar la localización celular de la proteína Eh-L10 en la cepa sobreproductora revelaron que esta proteína se encuentra de manera abundante en el citoplasma, lo cual concuerda con los estudios de fraccionamiento celular en los que se ha ubicado asociada a ribosomas en el retículo endoplásmico (Loftus y col., 1997). Además de ubicarla en el citoplasma, se pudo observar una señal intensa en el núcleo celular que resulta consistente de acuerdo a la función propuesta de regulador negativo del factor de transcripción nuclear c-Jun (Monteclaro y Vogt, 1993) y concuerda con por lo menos dos reportes previos en los que se ubica a QM en el núcleo. Eisinger y colaboradores en 1997 reportaron que la proteína homóloga a QM en *Saccharomyces cerevisiae* denominada QSR 1 podría tener una localización nuclear; mientras que Imafuku y colaboradores en 1999 observaron en neuronas humanas de la línea F9 un transporte de QM hacia el núcleo celular mediado por otra proteína llamada presenilina 1 (PS1). Al encontrarse QM en núcleo se observó que se inhibía la unión del homodímero Jun-Jun a la región consenso de AP-1 y por lo tanto no había una transactivación de genes por parte de Jun. Se ha propuesto que PS1 es un tipo de transportador intracelular con especificidad relativamente baja; entre las moléculas que se unen a PS1 se han identificado a APP (Wargai y col., 1997), casenilina (Buxbaum y col., 1998), β -catenina (Zhang, Z., 1998), filamina (Zhang, W., 1998) y Tau (Takashima y col., 1998) además de QM (Imafuku y col., 1999). Hasta la fecha no se tiene conocimiento de una proteína homóloga a PS1 en *E. histolytica* por lo que resultaría arriesgado hipotetizar sobre un transporte de Eh-L10 hacia el núcleo mediado por presenilina; sin embargo se tiene conocimiento de que algunos factores de transcripción como NF-AT que normalmente se encuentran en el citoplasma pueden ser translocados al núcleo y participar en la transcripción de otros genes. Este paso del citoplasma hacia el núcleo puede darse por una gran variedad de estímulos como luz UV, exposición a

oncogenes y promotores tumorales entre otros, que activan una cascada de señales de transducción (Israel, 1994). Recientemente se ha demostrado que QM puede ser fosforilada *in vitro* por la proteína cinasa C (Inada y col., 1997), lo que en algún momento podría facilitar su transporte hacia el núcleo.

Durante el desarrollo de este trabajo, también se logró expresar y purificar una proteína Eh-L10 recombinante en bacterias *Escherichia coli*, esta proteína tiene un peso aproximado de 24 kDa y es altamente reconocida por anticuerpos policlonales obtenidos a partir de ratones hembra de la cepa Balb/c, así como anticuerpos comerciales que reconocen a la proteína QM de humano. Para determinar en primer lugar la existencia de una interacción entre las proteínas nucleares de la amiba y la región consenso del complejo AP-1 se diseñaron los ensayos de retardo y fue posible estandarizar la técnica para *E. histolytica*. Los resultados obtenidos de la interacción entre las proteínas nucleares de la amiba y oligonucleótidos sintéticos que contienen la secuencia consenso de AP-1 nos indican que existe un complejo de proteínas nucleares de la amiba que reconoce esta región que es específica para la proteína Jun. Hasta la fecha se han reportado algunos genes en otros eucariontes, como GCN4 de *Saccharomyces cereviceae* (Hope y Struhl, 1988) y *cpc-1* de *Neurospora crassa* (Paluh y col., 1988) que pertenecen a la familia de oncoproteínas JUN, por lo que no resultaría extraño que en *E. histolytica* también existiera una proteína perteneciente a esta familia, además de que recientemente se han reportado en amiba homólogos a otros proto-oncogenes como *c-myc* (Leyva-Leyva y col., 1993).

Con el propósito de determinar si la proteína Eh-L10 de *Entamoeba histolytica* tiene la misma propiedad que su homóloga en pollo (Jif-1) para desestabilizar la unión del complejo dimérico Jun-Jun o Jun-Fos hacia la región consenso de AP-1, se realizaron los ensayos de competencia en los que se incubaron cantidades crecientes de la proteína Eh-L10 purificada junto con las proteínas nucleares de la amiba y la sonda AP-1. El resultado de este ensayo demuestra que

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. Se lograron producir cepas viables de *Entamoeba histolytica* Eh-L10⁺⁺ y Eh-L10⁻.
2. Existe un complejo de proteínas nucleares de *E. histolytica* que se une específicamente a la región consenso del complejo AP-1 también conocida como elemento de respuesta a TPA (TRE).
3. La proteína Eh-L10 de *Entamoeba histolytica* desestabiliza la unión del complejo de proteínas nucleares hacia la región consenso del complejo AP-1 de manera específica.
4. Se logró determinar que en la cepa sobreproductora (Eh-L10⁺⁺) la proteína Eh-L10 se localiza en el núcleo celular.

8. PERSPECTIVAS

Durante el desarrollo de este trabajo se demostró la existencia de proteínas nucleares de *Entamoeba histolytica* capaces de interactuar con la región consenso del complejo AP-1 también conocida como elemento de respuesta a TPA (TRE). Consideramos que es necesario aislar, purificar y caracterizar a los miembros del complejo proteico que se une a esta región, esto nos permitirá estudiar la regulación de genes involucrados en apoptosis y proliferación celular en *E. histolytica*.

Un aspecto muy importante en este trabajo es que se logró observar a la proteína Eh-L10 presente en el núcleo celular, sin embargo es necesario realizar estudios que nos permitan determinar si esta proteína tiene una función de inhibidor de la proliferación celular.

9. REFERENCIAS.

1. Alon, R. N., Bracha, R. y Mirelman, D. 1997. Inhibition of expression of the lysine-rich 30 kDa surface antigen of *Entamoeba dispar* by the transcription of its antisense RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **90**: 193-201.
2. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. y Karin, M. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*: **49**(6)729-739.
3. Angel, P. y Karin, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* **1072**: 129-157.
4. Ankri, S., Stolarsky, T., y Mirelman, D. 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases in *Entamoeba histolytica* does not affect cytopathic or hemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol. Microbiol.* **28**: 777-785.
5. Ankri, S. Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U. y Mirelman, D. 1999. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/Gal Nac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.* **33**(2): 327-337
6. Arroyo, R. y Orozco, E. 1987. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 151-158.

7. Bakker-Grunwald, T. y Wöstmann, C. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for primitive eukeriotic cell. *Parasitol. Today*. **9**: 27-31.
8. Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, L.S. y Solda, A.T. 1989. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* Encodes Ribosomal RNA. *J. Protozool.* **36**: 365-368.
9. Bohmann D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. y Tjian, R. 1987. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of the transcription factor AP-1. *Science*. **238**: 1386-1392.
10. Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.
11. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
12. Brandt, H. y Pérez Tamayo, R. 1970. Amibiasis. La Prensa Medica Mexicana. México.
13. Bray, D. y Vasiliev, J. 1989. Networks from mutants. *Nature*. **338**: 203-204.
14. Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E. y Wasco, W. 1998. Casenilins: a calcium-binding protein that interact with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* **4**: 1177-1181.

15. Caballero, A., Viveros, M., Salvatierra, B., Tapia, R., Sepúlveda, J., Gutiérrez, G., y Ortiz-Ortiz, L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 412-419.
16. Chan, Y. L., Diaz, J. J., Denoroy, L., Madjar, J. J. y Wool, I. G. 1996. The primary structure of rat ribosomal protein L10: relationship to a Jun-binding protein and to a putative Wilm's tumor suppressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**(3): 952-956.
17. Chávez-Ríos, R. y Vargas-Mejía, M. 2000. Isolation and Identification of L 10 Gene from *Entamoeba histolytica* Homologous to Wilm's Tumor Suppressor. *Arch. Med. Res.* **31**: 305-306.
18. Cox, D., Wessels, D., Soll, D. R., Hartwig, J. y Condeelis, J. 1996. Re-expression of ABP-120 Rescues Cytoskeletal, Motility, and Phagocytosis Defects of ABP-120⁻ *Dictyostelium* Mutants. *Mol. Biol. Cell* **7**: 803-823
19. Curran, T., MacConnell, W. P., van Straaten, F. y Verma, I. M. 1983. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* **3**(5): 914-921.
20. Curran, T. y Morgan, J. I. 1995. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J. Neurobiol.* **26**(3): 403-412.
21. de Groot, R. P., Schoorlemmer, J., van Genesen, S. T. y Kruijier, W. 1990. Differential expression of jun and fos genes during differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* **18**(11): 3195-3202.

22. Diamond, L. S. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.* **54**(5): 1047-1056.
23. Distel, R. J., Ro, H. S., Rosen, B. S., Groves, D. L. y Spiegelman, B. M. 1987. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell.* **49**(6): 835-844.
24. Dowdy, S. F., Lai, K., Weissman, B. E., Matsui, Y., Hogan, B.L.M y Stanbridge, E. J. 1991. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilm's microcell hybrid cells. *Nucleic Acids Res.* **19**(20): 5763-5769.
25. Eisinger, D. P., Dick, F. A. y Trumpower, B. L. 1997. Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining 40S and 60S subunits. *Mol. and Cell. Biol.* **17**: 5136-5145.
26. Etter, A., Bernard, V., Kenzelmann, M., Tobler, H. y Muller, F. 1994. Ribosomal heterogeneity from chromatin diminution in *Ascaris lumbricoides*. *Science.* **265**(5174): 954-956.
27. Farmer, A. A., Loftus, T. M., Mills, A. A., Sato, K. Y., Neill, J. D., Tron, T. Yang, M., Trumpower, B. L. y Stanbridge, E. J. 1994. Extreme evolutionary conservation of QM, a novel c-Jun associated transcription factor. *Hum. Mol. Genet.* **3**(5): 723-728.
28. Fisher, E. M., Beer-Romero, P., Brown, L. G., Ridley, A., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Willard, H. F., Bieber, F. R. y Page, D. C. 1990. Homologous ribosomal protein genes on the

- human X and Y chromosomes: escape from inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*. **63**(6): 1205-1218.
29. Franza, B. R., Sambucetti, L. C., Cohen, D. R. y Curran, T. 1987. Analysis of Fos protein complexes and Fos-related antigens by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Oncogene*. **1**(2):213-221.
30. Franza, B. R., Rauscher, F. J. III, Josephs, S. F. y Curran, T. 1988. The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*. **239**: 1150-1153.
31. Gerish, G., Segall, J. E., y Wallraff, E., 1989. Isolation and behavioral analysis of mutants defective in cytoskeletal proteins. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. **14**: 75-79.
32. Griffin, J. L. y Juniper, K. 1971. Ultrastructure of *Entamoeba histolytica* from human amoebic dysentery. *Arch. Pathol.* **91**(3): 271-280.
33. Hai, T. y Curran, T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**(9): 3720-3724.
34. Hamann L., Nickel R. y Tannich E. 1995. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**(19): 8975-8979.

35. Hart, K., Klein, T. y Wilcox, M. 1993. A Minute encoding a ribosomal protein enhances wing morphogenesis mutants. *Mech. Dev.* **43**: 101-110.
36. Hattori, K., Angel, P., Le Beau, M. M., y Karin, M. 1988. Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(23): 9148-9152.
37. Hirai, S. I., Ryseck, R. P., Mehta, F., Bravo, R. y Yaniv, M. 1989. Characterization of jun D: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J.* **8**(5): 1433-1439.
38. Hope, I. A. y Struhl, K. 1986. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell.* **46**(6):885-894.
39. Imafuku, I., Masaki, T., Waragai, M., Takeuchi, S., Kawabata, M., Hirai, S., Ohno, S., Nee, L. E., Lippa, C. F., Kanazawa, I., Imagawa, M. y Okazawa, H. 1999. Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *J. Cell. Biol.* **147**(1): 121-133.
40. Ings, R. M. J., McFadzean, J. A. y Ormeod, W. E. 1974. The Mode of Action of Metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other Micro-organisms. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 1421-1429.
41. Israel, A. 1994. NF-AT comes under control. *Nature.* **369**: 443-444.
42. Janson, A., Gillin, F., Kagardt, U. y Hagblom, P. 1994. Coding for hemolysin within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. *Science.* **263**: 1440-1443.

43. Johnson, R. S., van Lingen, B., Papaioannou, V. E. y Spiegelman, B. M. 1993. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* 7: 1309-1317.
44. Kaneko, K., Kobayashi, H., Onodera, O., Miyatake, T. y Tsuji, S. 1992. Genomic organization of a cDNA (QM) demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilm's microcell hybrid cells and its localization to Xq28. *Hum. Mol. Genet.* 1(7): 529-533.
45. Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270(28): 16483-16486.
46. Karin, M., Liu, Z. y Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9(2): 240-246.
47. Kim, J., Chubatsu, L. S., Admon, A., Stahl, J., Fellous, R. y Linn, S. 1995. Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *J. Biol. Chem.* 270(23):13620-13629.
48. Knigh, R., Skolimowski, I.M. y Edwards, D.I. 1978. The Interaction of Reduced Metronidazole with DNA. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2089-2093.
49. Latchman, D. S. 1995. The Mobility-Shift Assay. En Wiley-Liss inc.(ed.): *Methods in Molecular and Cellular Biology.* 5: 137-144.

50. Lee, W., Mitchell, P. y Tjian, R. 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*. **49**(6): 741-752.
51. Leippe, M., Andra, J. y Müller-Eberhard, H.J. 1994a. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:2602-2606.
52. Leippe, M., Andra, J. y Müller-Eberhard, H.J. 1994b. The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology*. **87**: 5-18.
53. Leippe, M. 1997. Amoebapores. *Parasitol. Today*. **13**(5): 178-183.
54. Leroy, A., Mareel, M., De Bruyne, G., Bailey, G. Y Neils, H. 1995. Metastasis of *Entamoeba histolytica* compared to colon cancer: one more step in invasion. *Invasion and Metastasis*. **14**: 177-191.
55. Leyva-Leyva, M., Gariglio, P., Rangel, L. M., Valdes, J., Ayala, P. y Orozco, E. 1993. Expression of sequences related to *c-myc* in *Entamoeba*. *Parasitol. Res*. **79**: 153-159.
56. Lioutas, C., Schmetz, C. y Tannich, E. 1995. Identification of Various Circular DNA Molecules in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*. **80**: 349-352.
57. Loftus, T. M., Nguyen, Y. H. y Stanbridge, E. J. 1997. The QM protein associates with ribosomes in the rough endoplasmatic reticulum. *Biochemistry*. **36**: 8224-8230.

58. Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R. y Samuelson, J. 1999. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("cripton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2198-2205.
59. Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. y Vogt, P. K. 1987. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**(9):2848-2852
60. Martínez-Palomo, A. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Great Britain.
61. Martínez-Palomo, A., Gonzalez-Robles, A., Chávez, B., Orozco, E. y Fernandez-Castelo, S. 1985. Structural basis of cytolytic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **32**(1): 166-175.
62. Martínez-Palomo, A. 1989. Amibiasis. Ed. Médica Panamericana. México.
63. Mattern, C. F. T., Keister, D. B. y Caspar, P. A. 1978. A rapid "in vitro" assay for virulence of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**(5): 882-887.
64. Matrisian, L. M., Wright, J., Newell, K. y Witty, J. P. 1994. Matrix-degrading metalloproteinases in tumor progression. *Princess Takamatsu Symp.* **24**: 152-161.
65. Monteclaro, F. S. y Vogt, P. K. 1993. A jun-binding protein related to a putative tumor suppresor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 6726-6730.

66. Nickel, R. y Tannich, E. 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**(15): 7095-7098.
67. Nishimura, T. y Vogt, P. K. 1988. The avian cellular homolog of the oncogene jun. *Oncogene*. **3**(6): 659-663.
68. Noble, E. R. y Noble, G. A. 1976. The biology of animal parasites. Lea and Febiger Ed. Philadelphia, USA.
69. Orozco, E., Solís, F.J., Domínguez, J., Chávez, B. y Hernández, F. 1988. *Entamoeba histolytica*: Cell Cycle and Nuclear Division. *Exp Parasitol*. **67**: 85-95.
70. Orozco, E., Benitez-Bibriesca, L. y Hernandez, R. 1994. Invasion and metastasis mechanism in *Entamoeba histolytica* and cancer cells. Some common cellular and molecular features. *Mutation Res*. **305**: 229-239.
71. Paluh, J. L., Orbach, M. J., Legerton, T. L. y Yanofsky, C. 1988. The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene *v-jun*-encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 3728-3732.

72. Phillips, B. P., Diamond, L. S., Bartgis, I. L. y Stuppler, S. A. 1972. Results of intracecal inoculation of germfree and conventional guinea pigs and germfree rats with axenical cultivated *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **19**: 498-499.
73. Powell, S.J., Wimot, A.J. y Eldson-Dew, R. 1966. Metronidazole in Amoebic Dysentery and Amoebic Liver Abscess. *Lancet.* 1329-1331.
74. Que, X. y Reed, S.L. 1997. The Role of Extracellular Cysteine Proteinases in Pathogenesis of *Entamoeba histolytica* Invasion. *Parasitol. Today.* **13**(5): 190-194.
75. Rasmussen, R., Benevegnu, D., O'Shea, E. K., Kim, P. S. y Alber, T. 1991. X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**(2): 561-564.
76. Ravdin, J.I. 1989. *Entamoeba histolytica*: from Adherence to Enteropathy. *J. Infect. Dis.* **159**(3): 420-429.
77. Rosales-Encina, J. L., Meza, I., López-De León, A., Talamás-Rohana, P. Y Rojkind, M. 1987. Isolation of a 220-Kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* **156**: 790-796.
78. Ryder, K., Lau, L. F. y Nathans, D. 1988. A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(5): 1487-1491.

-
79. Ryder, K., Lanahan, A., Perez-Albuerne, E. y Nathans, D. 1989. jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**(5): 1500-1503.
80. Ryseck, R. P., Hirai, S. I., Yaniv, M. y Bravo, R. 1988. Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblast. *Nature.* **334**(6182): 535-537.
81. Ryseck, R. P. y Bravo R. 1991. c-JUN, JUN B and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene.* **6**(4): 533-542.
82. Sassone-Corsi, P., Lamph, W. W., Kamps, M. y Verma, I. M. 1988. fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell.* **54**(4): 553-560.
83. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M. y Schaffner, W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared for a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**(15): 6419.
84. Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. y Wagner, E. F. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* **13**(5): 607-619.
85. Sharma, M. 1996. *Entamoeba invadens*: Characterization of Cysteine Proteinases. *Exp. Parasitol.* **84**: 84-91.

86. Smith, J. W., McQuay, R. M., Ash, L. R., Melvin, D. M., Orihel, T. C. y Thompson, J. H. 1989. *Diagnostical medical parasitology intestinal protozoa*. American Society of Clinical Pathologist, Education Products Division. USA.
87. Stanbridge, E., Farmer, A., Mills, A., Loftus, T., Kongkasuriyachai, D., Dowdy, S. y Weissman, B. 1994. Molecular characterization of QM, a novel gene with properties consistent with tumor suppressor function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **59**: 573-579.
88. Struhl, K. 1987. The DNA-binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell.* **50**(6): 841-846.
89. Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihomatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. y Wolozin, B. 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthetase kinase-3 beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 9637-9641.
90. Tannich, E., Ebert, F., y Horstmann, R.D. 1991. Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 1849-1853.
91. Tovar, J., Fischer, A. y Clark, C. G. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1013-1021.

92. Tron, T., Yang, M., Dick, F.A., Schmitt, M. E. y trumpower, B. L. 1995. QSR1, an essential yeast gene with a genetic relationship to a subunit of the mitochondrial cytochrome bcl complex, is homologous to a gene implicated in eukaryotic cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **270**: 1-10.
93. Vogt, P. K. y Bos, T. J. 1990. jun: oncogene and transcription factor. *Adv. Cancer Res.* **55**: 1-35.
94. Walsh, J.A. 1988. en Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. Ravdin, J. I., ed. pp. 93-105.
95. Watson, K. L., Konrad, K. D., Woods, D. F. y Bryant, P. J. 1992. *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**(23): 11302-11306.
96. World Health Organization. 1995. The World Health Report (The World Health Organization, Geneva).
97. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. y Selkoc, D. J. 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endo-proteolysis and γ -secretase activity. *Nature.* **338**: 513-516.
98. Wool, I. 1996. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *TIBS.* **21**: 164-165

-
99. Young, M. R., Li, J. J., Rincon, M., Flavell, R. A., Sathyanarayana, R. H. y Colburn, N. 1999. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**(17): 9827-9832.
100. Zhang, W., Han, S. W., Mckeel, D. W., Goate, A. y Wu, J. Y. 1998. Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J Neurosci*. **18**(3):914-22.
101. Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X. y Yanker, B. A. 1998. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*. **395**(6703): 698-702.

10. APÉNDICE.**PREPARACIÓN DE MEDIO LURIA-BERTRANI**

NaCl..... 10 g

Peptona..... 10 g

Extracto de levadura..... 5 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH y aforar a 1 l con agua.

2YT

NaCl..... 5 g

Peptona..... 16 g

Extracto de levadura..... 10 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH y aforar a 1 l con agua.

TYI-S-33

Peptona..... 183 g

Dextrosa..... 61 g

NaCl..... 12.2 g

KH₂PO₄ monobásico..... 3.7 g

KH₂PO₄ dibásico..... 6.2 g

L-cisteina..... 6.2 g

Ácido ascórbico..... 1.2 g

Citrato Férrico de Amonio..... 0.15 g

Ajustar pH a 6.8 con NaOH y aforar a 5 l con agua.

TBE 5X

Tris-base.....	54.0 g
Ácido bórico.....	27.5 g
EDTA.....	4.65 g

Aforar a 1 l con agua

OBTENCIÓN DE NÚCLEOS

SOLUCIÓN A

Hepes pH 7.9 10 mM.....	0.5 ml de Hepes 1 M pH 7.9
MgCl ₂ 1.5 mM.....	75 µl de MgCl ₂ 1 M
KCl 10 mM.....	0.5 ml de KCl 1 M
DTT 0.5 mM.....	25 µl de DTT 1 M
PMSF 0.5 mM.....	250 µl de PMSF 0.1 M

Aforar a 50ml con agua.

SOLUCIÓN C

Hepes pH 7.9 20 mM.....	1 ml de Hepes pH 7.9 1 M
NaCl 0.42 M.....	21 ml de NaCl 1 M
EDTA 1mM.....	0.1 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0
EGTA 1 mM.....	0.1 ml de EGTA 0.5 M pH 8.0
DTT 0.5 mM.....	50 µl de DTT 1 M
PMSF 0.5 mM.....	50 µl de PMSF 1 M

Benzamidina 2 mM..... 1 ml de Benzamidina 100 mM

Aforar a 50 ml con agua

PREPARACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

PMSF 100 mM.....	0.871 g en 50 ml de isopropanol
Pepstatina A 1 mg.....	1 mg por ml de etanol
Leupeptina 10 mg.....	10 mg por ml de agua
Aprotinina 10 mg.....	10 mg por ml de HEPES 0.01 M pH 8.0
Benzamidina 100 mM.....	0.8 g en 50 ml de etanol
E-64 1mg.....	1 mg por ml de agua

CÓCTEL DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

CONCENTRACIÓN FINAL	STOCK
PMSF 0.5 mM.....	5 µl de PMSF 100 mM
Benzamidina 2 mM.....	20 µl de Benzamidina 100 mM
Aprotinina 5 µg/ml.....	0.5 µl de Aprotinina 10 mg/ml
Pepstatina A 5 µg/ml.....	5 µl de Pepstatina A 1 mg/ml
Leupeptina 5 µg/ml.....	0.5 µl de Leupeptina 10 mg/ml
E-64 5 µg/ml.....	5 µl de E-64 1 mg/ml
Volumen final.....	1 ml

BUFFER DE CORRIDA 4X PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Glicina.....	14.4 g
Tris-base.....	3.0 g
SDS	100 g

Aforar a 1l con agua

BUFFER DE TRANSFERENCIA

Glicina.....	59.2 g
Tris-base.....	12.12 g
Metanol.....	800 ml
Aforar a 4 l con agua	

Anticuerpos utilizados.

policlonal anti-Eh-L10 [200 µg/ml]

IgG anti-raton acoplado a peroxidasa [1.5 mg/ml]

IgG anti-raton acoplado a FITC [1.5 mg/ml]

Secuencias de los oligonucleotidos utilizados.

Not I Eh-L10: 5' ATAAGAATGCGGCCGCATGGGAAGAAGACCAGGAAGA 3'

Bgl II Eh-L10: 5' GAAGATCTTCGTAACTTTTGGAAGTGGAC 3'

Xba I Eh-L10 Rev: 5' TGCTCTAGAGCATTAGTAACTTTTGGAAGTGG 3'

AP 1-1: 5' TCGAAGCTATGACTCATCAGGTCGA 3'

RAP 1-1: 5' TCGACCTGATGAGTCATAGCTTCGA 3'

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Características de los vectores empleados.

Vector	Propiedades	Referencia
pExEhNeo	Contiene el gen NEO (0.7 Kb) que confiere resistencia a geneticina, este se encuentra flanqueado por las regiones UTR del gen de actina de la propia amiba. Tiene clonado el gen CAT en sitios Kpn I en 5' y Bam HI en 3' flanqueado por la región UTR del gen de lectina hacia el extremo 5' y la región UTR del gen de actina hacia el extremo 3'. CAT puede ser sustituido por el gen de interés; este vector es empleado para generar cepas que sobre-expresen el gen que se ha insertado en su sitio de clonación múltiple.	Hamann y col., (1995). <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> 92 : 8975-8979.
pSA8	Contiene el gen NEO (0.7 Kb) que confiere resistencia a geneticina, este se encuentra flanqueado por las regiones UTR del gen de actina de la propia amiba. Su sitio de clonación múltiple esta flanqueado por las regiones UTR de la proteína ribosomal L21 (denominadas rgp34) y ha sido utilizado con éxito para inhibir la expresión de genes por medio de antisentidos	Ankri y col., (1998). <i>Mol. Microbiol.</i> 28 : 777-785.
pProExHtc	Este es un vector de expresión procarionte que contiene la secuencia del promotor Trc y del sitio de unión a ribosomas (RBS). Este vector adiciona una secuencia que codifica para 6 histidinas (6xHis) en el extremo 5' del gen que se ha insertado en el sitio de clonación.	ProEx™Ht Prokaryotic Expression System. GIBCO. Cat. No. 10711-018