

00591
13
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

**Programa de Maestría y Doctorado
en Ciencias Bioquímicas**

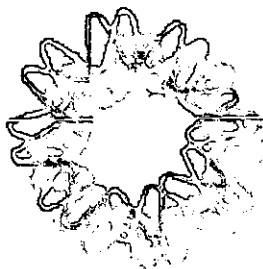
2.35.21
**Clonación y localización intracelular de la subunidad
de 54 kDa de la partícula de reconocimiento de la
secuencia señal (SRP54) de *Entamoeba histolytica***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA



Cuernavaca, Mor. Junio de 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.



Con todo mi amor

A Rosy, Andrés y Fernando

A mis padres Cecilia y Antonio

**A mis hermanos Ramón, Enrique,
Miguel, Julio y Carolina**

*El presente trabajo fue realizado en el
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, UNAM.*

*Bajo la dirección del
DR. ALEJANDRO ALAGON CANO*

*Con el apoyo de los donativos
DGAPA-UNAM IN209095, IN207097 e
IN208400, y CONACyT 27826-N y 30079-N*

Durante mis estudios de posgrado, fui becario del *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)* y de la *Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)* de la UNAM.

Durante el periodo 1998-99, recibí un donativo del *Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)* de la UNAM.

Durante el periodo 1997-2000, fui reconocido como *Candidato a Investigador Nacional* por el *Sistema Nacional de Investigadores (SNI)*.

AGRADECIMIENTOS

A el *Dr. Alejandro Alagón*, por ser más que un tutor, un AMIGO.

A los *Dres. Luis Miguel Salgado y Paul M. Lizardi*, por el apoyo recibido durante las primeras etapas de este proyecto.

A los *Dres. Rosana Sánchez y Roberto Stock*, por el apoyo experimental, y por sus acertados comentarios, durante el desarrollo de este trabajo.

A los *Dres. Enrique Merino, Mario Zurita, Jorge Nieto y Victor Tsutsumi*, por sus comentarios y sugerencias durante los comités tutorales, y por fungir como co-tutores.

A los *Dres. Edmundo Calva, Mario Zurita, Roberto Hernández, Ricardo Mondragón, Susana López, Federico Sánchez y Alejandro Alagón*, por sus comentarios y observaciones durante la escritura de la tesis, y por fungir como jurado de examen de grado.

A *Felipe Olvera, Alejandro Olvera y Olegaria Benítez*, por su apoyo técnico en el laboratorio del Dr. Alagón.

A *René Hernández y Maricela Olvera*, por su apoyo técnico en la unidad de secuenciación automática de DNA.

A *Paul Gaytan y Eugenio López*, por su apoyo técnico en la unidad de síntesis de oligonucleótidos.

A *Elizabeth Mata Moreno, Graciela Cabeza Pérez y Sergio González Trujillo*, por su apoyo técnico en la unidad de bioterio.

A *Xochitl Alvarado*, por su apoyo técnico en la unidad de microscopía confocal.

A *Angélica Linares*, por su invaluable apoyo administrativo en el laboratorio del Dr. Alagón.

A *todos mis compañeros de laboratorio*, por los inolvidables momentos que pasamos juntos.

A *mi esposa, mis hijos, mis papás y mis hermanos*, por ser algo muy especial en mi vida.

A todos ellos ; **MUCHAS GRACIAS !**

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	i
INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES.....	2
2.1. <i>Tráfico intracelular y vía de secreción de proteínas en células eucariotas</i>	2
2.1.1. <i>Compartimentalización celular</i>	2
2.1.2. <i>Tráfico intracelular</i>	2
2.1.3. <i>Transporte a través de la vía de secreción de proteínas</i>	3
2.2. <i>Transporte y translocación de proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico</i>	6
2.2.1. <i>Secuencia señal</i>	6
2.2.2. <i>Mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal y maquinaria de translocación</i>	7
2.2.3. <i>Partícula de reconocimiento de la secuencia señal</i>	8
2.3. <i>Subunidad de 54 kDa del complejo SRP (SRP54)</i>	9
2.4. <i>Entamoeba histolytica como modelo de estudio</i>	11
2.4.1. <i>Biología y ciclo de vida</i>	11
2.4.2. <i>Morfología y organización estructural</i>	12
2.4.3. <i>Organización genética</i>	13
2.4.4. <i>Particularidades de eucariote atípico</i>	13
2.4.5. <i>Patogenicidad y factores de virulencia</i>	14
2.4.6. <i>Compartimentalización y marcadores moleculares de tráfico intracelular</i>	15
3. OBJETIVOS	16
<i>Objetivo general</i>	16
<i>Objetivos específicos</i>	16
4. MATERIALES Y METODOS	17
4.1. <i>Células</i>	17
4.2. <i>Radiomarcaje de la sonda</i>	17

4.3. Tamizado del banco genómico.....	18
4.4. Clonación de la secuencia genómica	18
4.5. Secuenciación de DNA	19
4.6. Análisis de secuencia y homología.....	19
4.7. Southern blot.....	20
4.8. Northern blot.....	21
4.9. Amplificación rápida del extremo 3' del DNA complementario (3'-RACE).....	22
4.10. Amplificación rápida del extremo 5' del DNA complementario (5'-RACE).....	23
4.11. Inferencia filogenética.....	25
4.12. Predicción de estructura secundaria y modelo tridimensional	25
4.13. Expresión y purificación de la proteína recombinante	26
4.14. Producción de anticuerpos policlonales	27
4.15. Purificación de anticuerpos policlonales	27
4.16. Inmunoblot	28
4.17. Inmunotinción, microscopía de fluorescencia y reconstrucciones volumétricas.....	28
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSION	45
7. CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFIA	50
ANEXO 1. Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sanchez-Lopez R, Stock RP, Lizardi PM and Alagón A (1997) <i>Entamoeba histolytica</i> contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. Mol Biochem Parasitol 88:225-235.....	56
ANEXO 2. Ramos MA, Stock RP, Sanchez-Lopez R, Olvera F, Lizardi PM and Alagón A (1997) The <i>Entamoeba histolytica</i> proteasome α -subunit gene. Mol Biochem Parasitol 84:131-135.....	67
ANEXO 3. Ramos MA, Sánchez-López R and Alagón A (2000) Genomic organization of a 7 kb genomic cluster from <i>Entamoeba histolytica</i> . Arch Med Res 31:S263-S265.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que ilustra las etapas tempranas de la vía secretora.....	4
Figura 2. Esquema que ilustra las etapas tardías de la vía secretora.....	5
Figura 3. Ilustración de la estructura básica de un péptido señal	6
Figura 4. Esquema del mecanismo de reconocimiento de la secuenciaseñal y ciclo del SRP..	7
Figura 5. Ilustración del complejo SRP de mamífero.....	8
Figura 6. Modelo cristalográfico de la proteína FFH de <i>T. aquaticus</i>	9
Figura 7. Modelo de superficie del dominio M de la proteína FFH de <i>T. aquaticus</i>	9
Figura 8. Modelo cristalográfico del dominio M de la proteína SRP54 de humano	10
Figura 9. Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	12
Figura 10. Microscopía electrónica de un trofozoíto de <i>E. histolytica</i>	13
Figura 11. Representación esquemática de la determinación del extremo 3' del DNA complementario de <i>EhSRP54</i>	23
Figura 12. Representación esquemática de la determinación del extremo 5' del DNA complementario de <i>EhSRP54</i>	24
Figura 13. Esquema de la organización génica del fragmento genómico de 7 kb y de la subclona de 2.3 kb de <i>E. histolytica</i>	30
Figura 14. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida del gen SRP54 de <i>E. histolytica</i>	31
Figura 15. Determinación del inicio de la transcripción del transcrito SRP54 de <i>E. histolytica</i>	32
Figura 16. Organización genómica y transcripción del gen SRP54 de <i>E. histolytica</i>	33
Figura 17. Comparación de secuencias SRP54. Matriz de identidades y similitudes de secuencias polipeptídicas SRP54 de varios organismos.....	35
Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencias SRP54.....	36
Figura 19. Arbol filogenético (filograma) de la familia de proteínas SRP54 generado por el algoritmo <i>neighbor-joining</i>	37
Figura 20. Predicción de estructura secundaria del dominio M de la secuencia SRP54 de <i>E.</i> <i>histolytica</i>	38
Figura 21. Predicción de la estructura tridimensional del dominio M de <i>EhSRP54</i>	39
Figura 22. Predicción de la estructura dimérica del dominio M de <i>EhSRP54</i>	40
Figura 23. Expresión y purificación de la proteína <i>EhSRP54</i> recombinante.....	41
Figura 24. Reconocimiento de la proteína <i>EhSRP54</i> en un lisado total amibiano mediante immunoblot	41
Figura 25. Inmunolocalización de la proteína SRP54 de <i>E. histolytica</i> 40X	42
Figura 26. Inmunolocalización de la proteína SRP54 de <i>E. histolytica</i> 100X	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Entamoeba</i> que infectan al intestino del hombre	11
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	14
Tabla 3. Avances en el estudio de la compartimentalización de <i>E. histolytica</i>	15
Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la secuenciación de <i>EhSRP54</i>	20

ABREVIATURAS

[α - ³² P]-dCTP	Trifosfato de deoxicitosina radioactivo, isótopo ³² P en el fosfato α
°C	Grados centígrados
A, dA, dATP	Adenosina, deoxiadenosina, trifosfato de deoxiadenosina
AG	Aparato de Golgi
A _{nm}	Absorbancia a nanómetros determinados, donde nm puede ser 260, 280, 405, 600
AP	Oligonucleótido adaptador
BLAST	Herramienta para la búsqueda de comparaciones basada en alineamientos locales
C, dC, dCTP	Citosina, deoxicitosina, trifosfato de deoxicitosina
cDNA	DNA complementario
CGN	Red del <i>cis-Golgi</i>
COP	Complejo proteico de la cubierta
DNA	Acido deoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetra-ácetico
ERGIC	Compartimiento intermedio entre RE y Golgi
<i>et al.</i>	<i>et alos</i> , y colaboradores
FFH	Homólogo a la proteína SRP54
G, dG, dGTP	Guanosina, deoxiguanosina, trifosfato de deoxiguanosina

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Entamoeba</i> que infectan al intestino del hombre	11
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>E. histolytica</i>	14
Tabla 3. Avances en el estudio de la compartimentalización de <i>E. histolytica</i>	15
Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la secuenciación de <i>EhSRP54</i>	20

ABREVIATURAS

[α - ³² P]-dCTP	Trifosfato de deoxicitosina radioactivo, isótopo ³² P en el fosfato α
°C	Grados centígrados
A, dA, dATP	Adenosina, deoxiadenosina, trifosfato de deoxiadenosina
AG	Aparato de Golgi
A _{nm}	Absorbancia a nanómetros determinados, donde nm puede ser 260, 280, 405, 600
AP	Oligonucleótido adaptador
BLAST	Herramienta para la búsqueda de comparaciones basada en alineamientos locales
C, dC, dCTP	Citosina, deoxicitosina, trifosfato de deoxicitosina
cDNA	DNA complementario
CGN	Red del <i>cis-Golgi</i>
COP	Complejo proteico de la cubierta
DNA	Acido deoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetra-ácetico
ERGIC	Compartimiento intermedio entre RE y Golgi
<i>et al.</i>	<i>et alos</i> , y colaboradores
FFH	Homólogo a la proteína SRP54
G, dG, dGTP	Guanosina, deoxiguanosina, trifosfato de deoxiguanosina

g, mg, µg, ng	Gramo(s), miligramo(s), microgramos(s), nanogramo(s)
h, min, seg	Hora(s), minutos(s), segundo(s)
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
I, dI, dITP	Inosina, deoxiinosina, trifosfato de deoxiinosina
kDa	Kilodalton
L, mL, µL	Litro(s), mililitro(s), microlitro(s)
m, mm, µm	Metro(s), milímetro(s), micrómetro(s)
M, mM, µM, nM	Molar, milimolar, micromolar, nanomolar
Mac	Macintosh
mmHg	Milímetros de mercurio
NAC	Complejo asociado al polipéptido naciente
NCBI	Centro Nacional de Información en Biotecnología (Estados Unidos de Norteamérica)
NSF	Factor sensible a N-etil-maleimida
p.e.	Por ejemplo
pb, kb, Mb	Pares de bases, kilopares de bases, megapares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RACE	Amplificación rápida de extremos cDNA
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	<i>ranscriptasa reversa</i> , retrotranscriptasa
SNARE	Receptores de unión a factores NSF solubles
SRP	Partícula de reconocimiento de la secuencia señal
SRP54M	Dominio M de SRP54
SRPDB	Base de datos de proteínas SRP
SRPN	Subunidad de N kDa de SRP, donde N puede ser 9, 14, 19, 54, 68, 72
SRPR	Receptor de SRP
SSR	Receptor de la secuencia señal
T, dT, dTTP	Timidina, deoxitimidina, trifosfasfato de deoxitimidina
<i>Ta</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TGN	Red del <i>trans-Golgi</i>
TRAM	Proteína de membrana asociada a la proteína translocante
U	Unidades enzimáticas
ufp	Unidades formadoras de placas
vol	Volumen o volúmenes
VTC	Arreglos de vesículas y túbulos
WHO	Organización Mundial de la Salud
Xg	Número de veces la velocidad de la gravedad (unidades de centrifugación)

RESUMEN

El protozoario *Entamoeba histolytica* es el parásito intestinal causante de la amibiasis en humanos. Estructuralmente, es un eucariote unicelular simple, caracterizado por la ausencia de algunos organelos diferenciados como mitocondria y peroxisomas, y un retículo endoplásmico y aparato de Golgi subdesarrollados. A pesar de que *E. histolytica* presenta un sistema endomembranoso poco desarrollado, su alta actividad secretora caracteriza su patogenicidad y virulencia; es decir, proteínas con alta actividad citotóxica, como cisteín-proteasas y proteínas formadoras de poro, son liberadas desde el citoplasma hacia el ambiente extracelular, ocasionando daño tisular en humanos. Para estudiar la vía secretora de *E. histolytica*, se escogieron estrategias moleculares basadas en la identificación de proteínas involucradas en este proceso, tal es el caso de la partícula de reconocimiento de la secuencia señal (SRP), un complejo citoplasmático que participa en el transporte de proteínas hacia el retículo endoplásmico. En mamíferos, el complejo SRP está constituido de seis subunidades proteicas (9, 14, 19, 54, 68 y 72 kDa) y una molécula de RNA (RNA 7S). Siendo la subunidad de 54 kDa, o SRP54, una proteína clave en la función del complejo SRP, ya que se encarga del reconocimiento y de la unión con la secuencia señal de los polipéptidos nacientes.

La presente tesis describe la clonación y caracterización molecular, así como la localización intracelular, de la proteína SRP54 de *E. histolytica*. La secuencia nucleotídica fue aislada a partir del tamizado de un banco genómico, usando un producto de PCR como sonda. El análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 2.3 kb, obtenido a partir de una clona genómica de 7 kb, reveló la presencia de un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 487 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 53.8 kDa. La proteína deducida presenta identidades de 21-45 % con respecto a otras proteínas SRP54 homólogas. Los dominios funcionales descritos para proteínas SRP54, tales como el N-terminal de unión a GTP (dominio G) y el C-terminal rico en metioninas (dominio M), están presentes en la secuencia amibiana. Los análisis tipo Southern y northern blot muestran que el gen SRP54 está presente como copia única en el genoma de *E. histolytica* y se transcribe como RNA poliadenilado en el estadio de trofozoito. El transcrito SRP54 contiene un residuo G en el extremo 5', sugiriendo que un mecanismo de *capping* está presente en *E. histolytica*. El análisis evolutivo, mediante inferencia filogenética usando proteínas SRP54, coloca a *E. histolytica* como una divergencia temprana de la ramificación eucariota. La predicción de modelos tridimensionales, basados en homología, muestran que el dominio M se pliega de manera similar al homólogo de humano, prediciendo que un surco hidrofóbico es la estructura de reconocimiento de la secuencia señal en SRP54 de *E. histolytica*. La distribución intracelular de la proteína SRP54 sugiere que el complejo SRP se localiza tanto en el citosol de manera libre y, posiblemente, asociado en regiones celulares que podrían ser estructuras equivalentes al retículo endoplásmico. La identificación de la proteína SRP54 en *E. histolytica* constituye la primera evidencia de proteínas SRP en protozoarios; aún más, es la primera aproximación al mecanismo de transporte de proteínas hacia el espacio extracelular en este parásito.

ABSTRACT

The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is the causal agent of human amebiasis. It is a structurally simple eukaryotic cell, characterized by the lack of some differentiated organelles such as the mitochondria and peroxisomes, and with an under-developed Golgi complex and endoplasmic reticulum. Besides the lack of a well-developed endomembrane system, *E. histolytica* has high secretory activities with a role in its pathogenicity and virulence. Proteins with high cytotoxic activity like, cysteine proteases and pore-forming peptides, are constantly delivered to the extracellular environment causing tissue damage to the host. In order to study the protein secretory pathway of *E. histolytica*, molecular strategies have been taken to identify proteins involved in this process, such as the signal recognition particle (SRP), a cytoplasmic complex which participates in the transport of proteins to the endoplasmic reticulum. In mammals, SRP consists of six protein subunits (9, 14, 19, 54, 68 and 72 kDa) and an RNA molecule (7S RNA). The 54 kDa subunit (SRP54) plays a key role in SRP function: it recognizes and binds to the signal sequences from the nascent polypeptides.

This thesis presents the molecular cloning and characterization of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle (SRP54) from *E. histolytica* as well as its intracellular localization. The nucleotide sequence of the SRP54 gene was isolated from an *E. histolytica* genomic library using a PCR probe. Nucleotide sequence analysis of a 2.3 kb fragment, obtained from a 7 kb genomic clone, revealed an open reading frame encoding 487 amino acid protein, with a predicted molecular weight of 53.8 kDa. The identities of the predicted protein with its homologues were between 21 and 45 %. Functional domains, previously defined for the SRP54-type proteins, were present in the *E. histolytica* sequence, such as the amino-terminal GTP binding domain (G domain) and the carboxy-terminal methionine-rich domain (M domain). Blotting analysis of nucleic acids revealed that the SRP54 gene is present as a single copy in the *E. histolytica* genome and being transcribed as a polyadenylated RNA in the trophozoite stage. The SRP54 transcript contains an extra G residue at the 5' end, suggesting the presence of a mechanism of capping in *E. histolytica*. Evolutionary analysis, by phylogenetic inference using the SRP54 protein family, located *E. histolytica* in an early divergence of the eukaryotic branch. Homology-based modeling showed that the *E. histolytica* SRP54 M domain folds in a similar way as the human homologue, predicting a hydrophobic groove as the signal sequence recognition structure in *E. histolytica* SRP54. The intracellular distribution of SRP54 suggest that the SRP complex is localized either free in the cytosol or associated to cellular compartments with a feasible functional role equivalent to the endoplasmic reticulum. Identification of the SRP54 homologue constitutes the first evidence for SRP related proteins in protozoans, and also the first approach to the mechanism for delivering protein to the extracellular environment in *Entamoeba histolytica*.

1. INTRODUCCION

El padecimiento desarrollado por personas infectadas con el protozooario parásito intestinal *Entamoeba histolytica*, denominado amibiasis, es la tercer causa de muerte por parasitosis en todo el mundo. Durante mucho tiempo se consideró la existencia de dos variedades morfológicamente indistinguibles de *E. histolytica*: una patógena, capaz de desarrollar amibiasis en personas infectadas; y otra, no patógena, presente en personas aparentemente infectadas e incapaz de desarrollar amibiasis. Datos bioquímicos, inmunológicos y genéticos acumulados durante muchos años de investigación, permitieron la redescrición de éstas como: *E. histolytica* (patógena) y *E. dispar* (no patógena) [Diamond y Clark, 1993]. En los últimos años ha aumentado el conocimiento sobre la biología de *E. histolytica*; principalmente, en la relación estructura-función de las proteínas involucradas en la destrucción de tejidos humanos. Actualmente, uno de los principales objetivos en el estudio de la biología celular de *E. histolytica* es el conocimiento de los mecanismos de invasión a tejidos humanos [WHO, 1997].

Morfológicamente, *E. histolytica* presenta un citoplasma aparentemente simple, caracterizado por presentar un sistema de transporte intracelular y vía de secreción de proteínas poco desarrollado. A la fecha, no se han encontrado estructuras membranosas similares al retículo endoplásmico o aparato de Golgi. Sin embargo, está bien documentado que ciertos productos amibianos son liberados desde el citosol hacia el ambiente extracelular, tales como fosfatasa ácida [Aragual *et al.*, 1989], cisteín-proteasas [McKerrow *et al.*, 1993], proteínas formadoras de poro [Lynch *et al.*, 1985], β -N-acetil-glucosaminidasa [Werries *et al.*, 1983] y colagenasa [Muñoz *et al.*, 1991]. Por tales motivos, la identificación de las estructuras celulares, o los equivalentes funcionales, involucrados en la vía de secreción de proteínas en *E. histolytica* reviste gran importancia para el conocimiento de los mecanismos de infección de este parásito. Por otro lado, la caracterización de mecanismos altamente conservados se ha convertido en un alternativa viable.

En el proceso de secreción de proteínas, uno de los mecanismos más conservados es el transporte de polipéptidos nacies hacia compartimientos intracelulares. Este mecanismo es dependiente del reconocimiento de un péptido señal por un complejo ribonucleoproteico denominado SRP, o partícula de reconocimiento de la secuencia señal. De tal manera que, para *E. histolytica*, la identificación y caracterización de la subunidad de 54 kDa del complejo SRP (SRP54) permitirá caracterizar el mecanismo de reconocimiento de polipéptidos que están destinados a seguir la ruta de secreción en este parásito. Aún más, la caracterización de otros componentes involucrados en este mecanismo, como el receptor de SRP, la peptidasa de señal o componentes de la maquinaria de translocación, favorecerá la caracterización de los componentes celulares del mecanismo involucrado en la primera etapa de la vía de secreción de proteínas en *E. histolytica*.

2. GENERALIDADES

2.1. Tráfico intracelular y vía de secreción de proteínas en células eucariotas

El tráfico intracelular y secreción de proteínas a través del sistema endomembranoso ha sido de particular interés en los últimos años. En 1975 un grupo de investigadores, encabezados por George Palade, formularon los lineamientos generales del transporte intracelular y vía secretora en células exócrinas de páncreas de perro [Palade, 1975].

2.1.1. Compartimentalización celular

El estudio de las membranas biológicas y su función en compartimientos intracelulares, es una rama de la biología celular que cada día adquiere mayor importancia. Una membrana separa todas las reacciones bioquímicas que suceden dentro de una célula, del ambiente que la rodea. Dentro de una célula eucariota, una membrana organiza y separa las reacciones bioquímicas de un organelo, generando compartimientos morfológicamente distintos y funcionalmente especializados [Alberts *et al.*, 1994; Mellman y Warren, 2000].

Por otro lado, debido a que las bicapas lipídicas son impermeables a muchas moléculas hidrofílicas, cada membrana especializada contiene transportadores responsables de la importación y exportación de metabolitos específicos. Además, cada membrana contiene los mecanismos necesarios para importar e incorporar las proteínas que hacen a cada compartimiento único. Los compartimientos intracelulares más comunes de una célula eucariota son citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi (AG), mitocondria, cloroplasto (en plantas), lisosomas y peroxisomas [Alberts *et al.*, 1994].

2.1.2. Tráfico intracelular

El mantenimiento de la organización estructural y funcional de una célula eucariota requiere de la correcta localización de sus proteínas y lípidos a su destino final. Esto se logra gracias al transporte intracelular de estas moléculas a través de su sistema endomembranoso. Varios modelos han surgido tratando de explicar el flujo intracelular de materiales; sin embargo, sólo dos modelos han logrado captar la atención: el modelo vesicular y el modelo de maduración de cisternas. La información generada a partir de una gran cantidad de estrategias experimentales, apoyan al modelo vesicular como el mecanismo general de transporte intracelular; a pesar de ello, el modelo de maduración de cisternas es aplicable para algunas células especializadas [Harter y Reinhard, 2000].

Transporte vesicular. La transferencia de materiales entre compartimientos intracelulares se lleva a cabo mediante pequeñas vesículas membranosas [Palade, 1975]. Los compartimientos donador y aceptor, típicamente, están compuestos de membranas bioquímicamente distintas. Por tal motivo, el transporte vesicular debe cumplir los principios básicos de selección molecular y anclaje vesicular. La selección molecular contempla la habilidad de selectivamente incluir o excluir proteínas de membrana y solubles, durante la formación de la vesícula naciente y, posteriormente, la capacidad de vaciar el contenido vesicular durante la fusión de membranas. El anclaje molecular considera que las vesículas nacientes de un compartimiento donador deben contener etiquetas moleculares, que le permiten la interacción y fusión sólo con el compartimiento aceptor apropiado [Mellman y Warren, 2000]. Estas etiquetas incluyen a las proteínas SNARE y Rab (GTPasas de bajo peso molecular) [Sogaard *et al.*, 1994], las cuales, en conjunto con otras proteínas, forman complejos específicos para cada organelo que permiten el reconocimiento y la sucesiva fusión de la vesícula al compartimiento aceptor [Mellman y Warren, 2000].

Maduración de cisternas. De acuerdo a este modelo, las moléculas son transportadas sin abandonar el lumen de la cisterna; es decir, para el transporte de moléculas demasiado grandes, como procolágena, se ha sugerido un mecanismo alternativo en el cual las cisternas del sistema endomembranoso maduran progresivamente. [Mironov *et al.*, 1997; Bonfanti *et al.*, 1998].

2.1.3. Transporte a través de la vía de secreción de proteínas

La vía de secreción de proteínas consta de las siguientes etapas: (1) transporte y translocación a través de la membrana del RE; (2) N-glicosilación y plegamiento en el lumen del RE; (3) transporte hacia el AG; (4) modificaciones en el AG; y (5) transporte vesicular hacia otros compartimientos intracelulares y el ambiente extracelular [Sakaguchi, 1997]. Para que una proteína sea madurada, seleccionada y enviada hacia su destino final, el tráfico vesicular a través de los compartimientos de la vía secretora debe ser direccional; es decir, una vesícula que emerge del RE debe unirse específicamente al *cis*-Golgi, una vesícula que gema del *cis*-Golgi debe fundirse al *medial*-Golgi, y así sucesivamente [Rothman y Wieland, 1996].

Transporte y translocación de proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico. Funcionalmente, esta etapa puede dividirse en dos fases: primero, el polipéptido naciente es identificado y transportado desde el citosol hacia el RE; y posteriormente, es translocado hacia el lumen del RE o permanece integrado en su membrana [Ng y Walter, 1994].

N-glicosilación y plegamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico. Durante la translocación del polipéptido nascente, en la membrana del RE, algunas proteínas, como Bip (de la familia HSP70), se unen a éste, asegurando un plegamiento correcto. Sin embargo, el plegamiento completo depende de otros factores, entre los que se encuentran la formación de puentes disulfuro, catalizada por la enzima PDI, y la transferencia y procesamiento de oligosacáridos, catalizada por el complejo oligosacaril transferasa. En conjunto, estas proteínas conforman el sistema de control de calidad del RE, el cual se asegura de que proteínas plegadas incorrectamente, o no plegadas, permanezcan en el RE, unidas a las lectinas calnexina o calreticulina, e impiden su exportación hacia el complejo de Golgi [Ellgaard *et al.*, 1999].

Transporte de proteínas hacia el aparato de Golgi. Una vez que las proteínas han sido plegadas correctamente, éstas abandonan el RE en sitios específicos caracterizados por la formación de vesículas cubiertas por un estructura denominada COPII [Mellman y Warren, 2000]. En estudios morfológicos, usando células secretoras altamente especializadas, se han definido sitios de formación de vesículas cubiertas por el complejo COPII [Orci *et al.*, 1994]. Por otro lado, se ha sugerido la existencia de complejos especializados que participan en esta etapa, los cuales constan de pequeñas estructuras tubulares y vesiculares que se funden entre sí formando un compartimiento intermedio denominado ERGIC [Harter y Reinhard, 2000] o VTC [Mellman y Warren, 2000]. Se ha considerado que este compartimiento participa en la selección y concentración de proteínas destinadas al transporte anterogrado hacia el AG y retrógrado hacia el RE [Bannykh *et al.*, 1996]. Posteriormente, las proteínas son transportadas desde ERGIC hacia la cara *cis* del complejo de Golgi mediante la formación de vesículas cubiertas por otro complejo denominado COPI (Figura 1).

Maduración de proteínas en el aparato de Golgi. A partir del *cis*-Golgi, las proteínas maduran durante su paso a través de las distintas cisternas del complejo de Golgi (*cis-medial-trans*). Algunas modificaciones como O-glicosilación y reestructuración de azúcares, sulfatación o fosforilación, y proteólisis, pueden suceder durante este proceso. El transporte a través del complejo de Golgi involucra movimiento vesicular en ambas direcciones

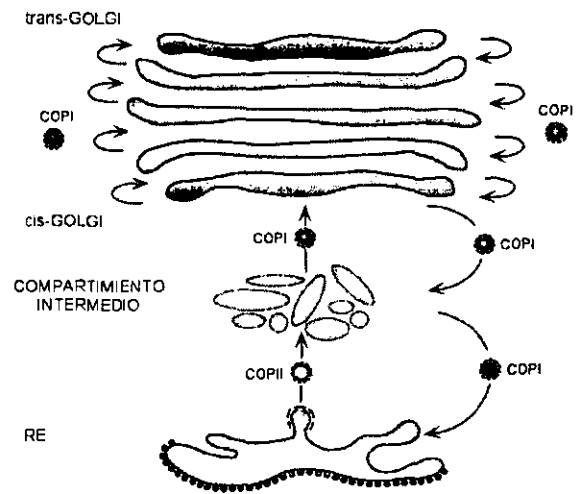


Figura 1. Esquema que ilustra las etapas tempranas de la vía secretoria.

[Mellman y Warren, 2000]. Durante el transporte retrógrado de componentes estructurales, así como de proteínas fugadas del RE, las vesículas cubiertas por el complejo COPI participan activamente: componentes del COPI interactúan con el tetrapéptido señal (KK/RR)XX, característico de proteínas membranales del RE, y selectivamente las concentran en el AG. De igual manera, las proteínas residentes del lumen del RE, como Bip o PDI, son seleccionadas y concentradas mediante la interacción del tetrapéptido KDEL (presente en el carboxilo terminal de su secuencia) con el receptor ERD2 del *cis*-Golgi. Estas proteínas se transportan hacia el RE vía el compartimento intermedio a través de vesículas cubiertas por el complejo COPI [Pelham, 1996]. Existen dos modelos que intentan explicar el movimiento anterógrado a través de las cisternas del Golgi. En el primer modelo, las enzimas residentes del AG y proteínas secretorias, que arriban al *cis*-Golgi vía vesículas cubiertas por el complejo COPI, son transportadas a través de las cisternas a medida que éstas maduran; es decir, la cisterna *cis* madura a *medial* y, posteriormente, a *trans*. En este modelo, las cisternas *cis* se renuevan constantemente a partir de componentes del ERGIC. En el otro modelo, las cisternas son visualizadas como estructuras estáticas a partir de las cuales las vesículas geman. En este modelo participan distintos tipos de vesículas cubiertas por el complejo COPI dependiendo de la ruta de destino (Figura 1) [Orci *et al.*, 1997].

Transporte de proteínas hacia compartimientos intracelulares y membrana plasmática. Las proteínas secretorias, y de membranas, destinadas a compartimientos post-Golgi son seleccionadas en las cisternas *trans*. Es decir, las proteínas destinadas a la vía secretora, o a la vía endosomal, son seleccionadas y transportadas en diferentes tipos de vesículas [Keller y Simons, 1997]. En esta etapa, las vesículas cubiertas de clatrina son las mejor caracterizadas. Sin embargo, vesículas no cubiertas han sido identificadas, aunque se desconoce su función [Harter y Reinhard, 2000]. Las proteínas destinadas a la membrana plasmática son transportadas en vesículas que se forman constitutivamente; mientras que, las proteínas destinadas a endosomas o lisosomas, se acumulan en regiones de la cisterna que expresan el complejo adaptador de clatrina [Mellman y Warren, 2000]. Por otro lado, las proteínas destinadas al espacio extracelular se acumulan en el *trans*-Golgi y, posteriormente,

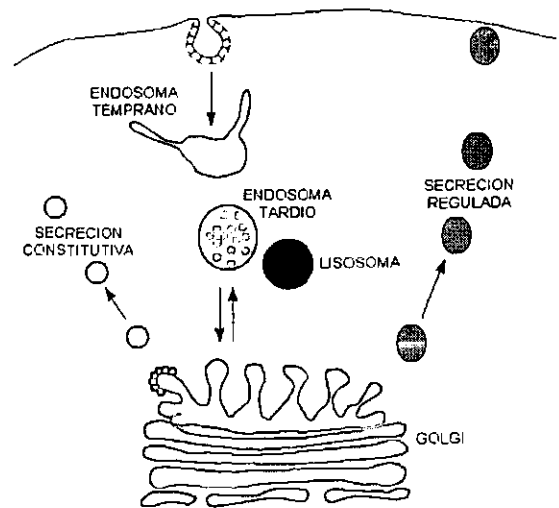


Figura 2. Esquema que ilustra las etapas tardías de la vía secretoria.

son secuestradas en grandes vesículas que generan los gránulos secretorios densos, característicos de algunas células exócrinas como las células acinares del páncreas. La formación de estos gránulos densos es una manera eficiente de concentrar y almacenar las proteínas secretorias antes de ser liberadas de manera regulada (Figura 2) [Orci *et al.*, 1984; Tooze y Tooze, 1986].

2.2. Transporte y translocación de proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico

En las células eucariotas, la síntesis de proteínas destinadas a compartimientos intracelulares, o al ambiente extracelular, es un proceso que se lleva a cabo en ribosomas unidos a la membrana del RE. Durante la biosíntesis, las proteínas solubles son translocadas hacia el lumen, mientras que las proteínas integrales se insertan en la membrana del RE [Alberts *et al.*, 1994]. En mamíferos, la translocación está acoplada con la biosíntesis (co-traducciona); mientras que en levadura, puede ser co-traducciona y/o post-traducciona. El mecanismo de translocación de proteínas a través de membranas es un proceso evolutivamente conservado: en *E. coli*, la membrana periplásmica cumple una función muy similar al RE [Schatz *et al.*, 1996].

La primera etapa de la síntesis de proteínas se lleva a cabo cuando los ribosomas se encuentran libres en el citosol. Estudios basados en esta observación permitieron la identificación de un mecanismo encargado de seleccionar a los ribosomas que sintetizan proteínas destinadas a la secreción, o a compartimientos intracelulares, y conducirlos hacia la membrana del RE [Blobel y Dobberstein, 1975]. Este mecanismo involucra un complejo citosólico, que reconoce a la secuencia señal del polipéptido naciente, y la interacción del complejo con un receptor presente en la membrana del RE [Walter y Johnson, 1994].

2.2.1. Secuencia señal

La secuencia señal, usualmente localizada en el extremo amino terminal del polipéptido naciente, juega un papel importante en el mecanismo de reconocimiento de proteínas destinadas hacia diferentes compartimientos intracelulares o extracelulares. La secuencia señal consiste de tres regiones: una región amino terminal polar (región N), donde se observan aminoácidos cargados positivamente; una



Figura 3. Ilustración de la estructura básica de un péptido señal.

región central hidrofóbica (región H) con al menos 7-8 aminoácidos hidrofóbicos; y una región carboxilo terminal (región C), la cual contiene residuos como prolina o glicina, donde se realiza el corte enzimático por la peptidasa de señal (Figura 3). El análisis comparativo de un gran número de péptidos señal indica que la longitud de éstos puede variar desde 15 hasta 50 residuos [Martoglio y Dobberstein, 1998; Sakaguchi, 1997]. El péptido señal es cortado co-traduccionalmente, cuando la porción madura del polipéptido naciente se ha elongado en más de 100 aminoácidos [Lyko *et al.*, 1995].

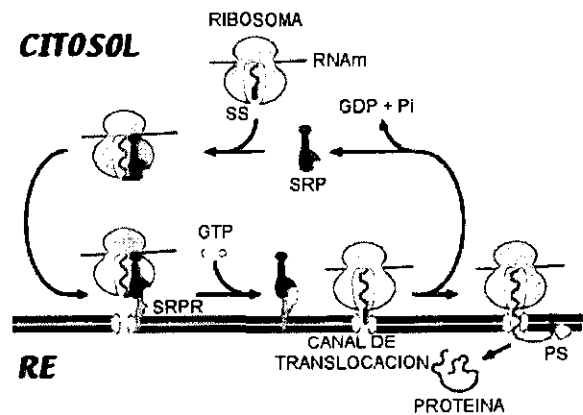


Figura 4. Esquema del mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal y ciclo del SRP.

2.2.2. Mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal y maquinaria de translocación

Mediante estudios experimentales *in vitro*, fueron identificados dos componentes proteicos necesarios para conducir al ribosoma desde el citosol hacia el RE: un complejo ribonucleoproteico citoplasmático denominado partícula de reconocimiento de la secuencia señal, o SRP, y su receptor (SRPR, complejo heterodimérico), localizado en la membrana del RE [Walter *et al.*, 1984; Rapoport, 1992]. El mecanismo inicia cuando el SRP se une a la secuencia señal (SS) del polipéptido naciente, en el momento que emerge del ribosoma, ocasionando que la elongación se detenga. Posteriormente, el complejo ribosoma-polipéptido-SRP es transportado hacia la membrana del RE, donde SRP se une con el receptor SRPR. Al momento de la interacción, moléculas de GTP se unen tanto al SRP como al SRPR, provocando un cambio conformacional. Esto ocasiona que la secuencia señal se separe del SRP y continúe la elongación. Enseguida sucede la hidrólisis del GTP, permitiendo la disociación y el reciclado del SRP. Por otro lado, el polipéptido naciente liberado se inserta en la membrana, mediante la unión de su secuencia señal con una proteína llamada peptidasa de señal (PS); simultáneamente, el complejo ribosoma-polipéptido naciente se une a componentes del canal de translocación de proteínas (Figura 4) [Walter y Johnson, 1994; Stroud y Walter, 1999]. Este canal provee un ambiente acuoso a través del cual el polipéptido naciente puede ser translocado [Crowley *et al.*, 1994]. Estudios realizados con microsomas de mamífero y de levadura, han permitido identificar al menos tres componentes de la maquinaria de translocación: el complejo Sec61, la proteína de membrana

TRAM y el receptor de SRP [Corsi y Schekman, 1996; Sakaguchi, 1997; Kalies y Hartmann, 1998].

Experimentos recientes, en modelos *in vitro*, usando el complejo SRP de mamífero y membranas microsomales rugosas, demostraron que la interacción del SRP con el péptido señal está regulada por el complejo de unión al polipéptido naciente, o NAC. En ausencia de NAC, polipéptidos sin secuencia señal pueden ser translocados a través de la membrana. De tal manera que, NAC es un complejo que previene la translocación inespecífica de proteínas carentes de señal [Sakaguchi, 1997; Stroud y Walter, 1999].

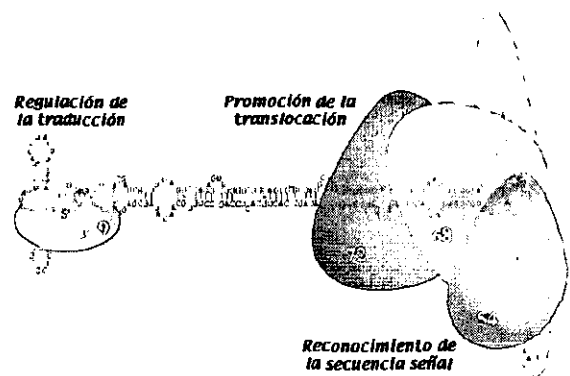


Figura 5. Ilustración del complejo SRP de mamífero. Se indican los componentes y los dominios funcionales del complejo.

2.2.3. *Partícula de reconocimiento de la secuencia señal*

El mecanismo de transporte y translocación, dependiente de SRP, está altamente conservado en todos los organismos. Tal conservación sugiere que la ruta para la secreción de proteínas tiene un origen evolutivo antiguo. Hasta la fecha, se han reportado homólogos de proteínas SRP en varias especies de los tres reinos [Gorodkin *et al.*, 2001]. SRP puede ser tan complejo, como en células de mamífero, donde consta de seis polipéptidos y una molécula de RNA; o tan simple, como en bacterias, donde sólo existe una molécula de 48 kDa (denominada FFH) unido a una molécula de RNA [Stroud y Walter, 1999].

En mamíferos, el SRP es un complejo ribonucleoproteico citoplasmático ubicuo que participa en la conducción de proteínas hacia la maquinaria de translocación en la membrana del RE. Este complejo consiste de una molécula de RNA 7S y seis polipéptidos de 9, 14, 19, 54, 68 y 72 kDa, respectivamente [Althoff *et al.*, 1994; Luirink y Dobberstein, 1994]. La función del RNA 7S es actuar como el soporte al cual las proteínas SRP se unen. Cada una de las proteínas interacciona individualmente, como monómero o dímero, con la molécula de RNA [Andreazzoli y Gerbi, 1991].

El complejo SRP participa en tres distintas actividades funcionales: reconocimiento de la secuencia señal, regulación de la elongación, y promoción de la translocación (Figura 5) [Siegel y Walter, 1988]. Estas actividades están contenidas en tres dominios diferentes del complejo: el heterodímero SRP9/14 participa en la detención de la elongación [Bovia *et al.*,

1994]; el heterodímero SRP68/72 es necesario para la interacción del SRP con su receptor [Lütcke *et al.*, 1993]. La subunidad SRP19 es la única proteína capaz de unirse al RNA 7S, independientemente de las otras proteínas. La unión de SRP19 induce un cambio conformacional en el RNA 7S, necesario para que la subunidad SRP54 se una al complejo [Zwieb, 1994]. La subunidad SRP54 interacciona directamente con la secuencia señal, tan pronto como ésta emerge del ribosoma [Bernstein *et al.*, 1989].

2.3. Subunidad de 54 kDa del complejo SRP (SRP54)

La proteína SRP54, o FFH en bacterias, es un componente importante en el mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal. Esta proteína consiste de por lo menos dos dominios funcionales: el dominio G, que consta de la secuencia amino terminal seguida de una secuencia que contiene los motivos de unión a GTP; y el dominio M, rico en metionina, el cual se encarga de la unión tanto con la molécula RNA 7S como con la secuencia señal (Figura 6) [Bernstein, 1998].

Durante mucho tiempo, se ha especulado acerca del mecanismo de reconocimiento del péptido señal por el SRP. La determinación de la estructuras cristalográficas de la proteína FFH de *Thermus aquaticus* y del dominio M de la proteína SRP54 de humano, han contribuido de manera significativa a la elucidación del

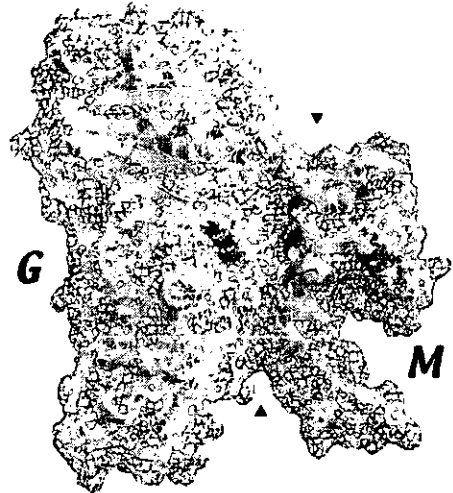


Figura 6. Modelo cristalográfico de la proteína FFH de *T. aquaticus*. Sobreposición de las representaciones en listones y superficie. La división entre los dominios G y M se identifica con puntas de flecha.

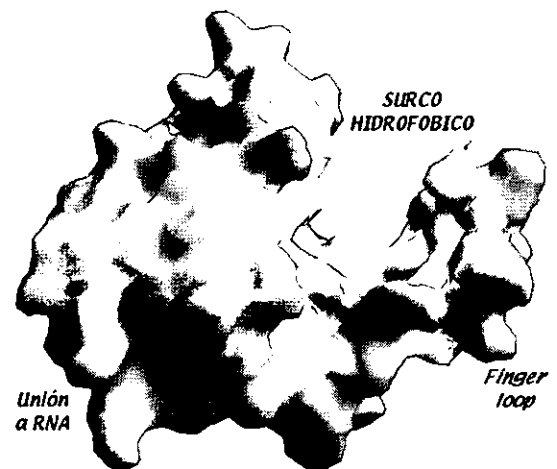


Figura 7. Modelo de superficie del dominio M de la proteína FFH de *T. aquaticus*. Los aminoácidos hidrofóbicos del surco se indican en color claro.

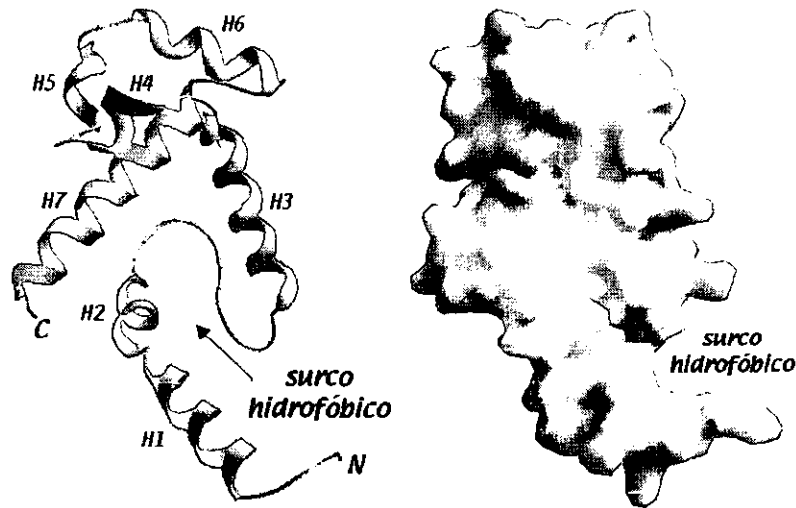


Figura 8. Modelo cristalográfico del dominio M de la proteína SRP54 de humano. En la representación de listones, se muestra el surco hidrofóbico, las α -hélices (H), y los extremos amino (N) y carboxilo (C). En la representación de superficie, los aminoácidos que contribuyen al carácter hidrofóbico del surco de muestras en color claro.

mecanismo de reconocimiento del péptido señal [Keenan *et al.*, 1998; Clemons *et al.*, 1999]. La característica más importante del dominio M de la proteína *TaFFH*, es la presencia de un surco formado por tres α -hélices y una horquilla flexible denominado *finger loop*. El surco está formado casi completamente por residuos hidrofóbicos y es suficientemente grande para permitir la unión de los péptidos señal (Figura 7). Por otro lado, la resolución de la estructura del dominio M de la proteína *HsSRP54* ha revelado similitudes y algunas diferencias con el homólogo de *T. aquaticus*. Ambas estructuras poseen un surco hidrofóbico, propuesto como el sitio de unión con el péptido señal. Sin embargo, la comparación de las estructuras monoméricas, en modelos digitalizados, muestran que el surco de *TaFFH* es corto y se une a un horquilla; mientras que en *HsSRP54M*, el surco es largo y profundo, con capacidad de unirse a una estructura α -hélice, conformación que usualmente adoptan los péptidos señal [Clemons *et al.*, 1999].

La estructura cristalográfica de la proteína *HsSRP54M* consiste de siete α -hélices (Figura 8). Las α -hélices 2, 3, 4 y una horquilla de 17 aminoácidos, localizado entre las hélices 2 y 3, forman el surco hidrofóbico. La estructura principal de éste, se caracteriza por la presencia de varios residuos hidrofóbicos, como Met, Ile, Pro, Gly y Phe. En la estructura cristalográfica, el surco hidrofóbico está ocupado por la α -hélice 1 de una molécula vecina, sugiriendo que el surco es el sitio de reconocimiento del péptido señal [Clemons *et al.*, 1999].

A pesar del alto contenido de metioninas en el dominio M, la posición de estos residuos no está estrictamente conservada. A partir de la predicción de estructura secundaria,

se sugirió que las metioninas formaban parte de varias α -hélices anfipáticas arregladas estructuralmente formando una bolsa hidrofóbica [Bernstein *et al.*, 1989]. Esta hipótesis ha sido cuestionada recientemente. En un análisis comparativo de secuencias SRP54, seguido de una predicción de estructura secundaria más estricta, se observó que las metioninas se localizan en agrupamientos muy cercanos a los extremos de las α -hélices o en horquillas [Gowda *et al.*, 1998]. Los modelos cristalográficos apoyan las observaciones anteriores: en la estructura de la proteína *TaFFH*, sólo tres de los 21 residuos comprometidos en el surco hidrofóbico son metioninas; por otro lado, cuatro de las 9 metioninas que contribuyen al carácter hidrofóbico del surco de la estructura *HsSRP54M*, están localizadas en horquillas [Clemons *et al.*, 1999]. Considerando lo anterior, la función de las metioninas radica sólo en la contribución al carácter hidrofóbico del surco de reconocimiento del péptido señal, debilitando la hipótesis de las α -hélices ricas en metioninas.

2.4. *Entamoeba histolytica* como modelo de estudio

Varias son las especies del género *Entamoeba* que infectan al intestino del hombre (Tabla 1). De éstas, sólo *E. histolytica* es considerada como patógena [Martínez-Palomo y Espinoza-Castellano, 1998]. El padecimiento desarrollado por individuos infectados con este parásito se denomina amibiasis [WHO, 1997]. En todo el mundo, se estiman alrededor de 50 millones de casos de amibiasis, ocasionando más de 40,000 muertes por año [Walsh, 1986]. En México, al menos un millón de casos de amibiasis y más de 1000 muertes son reportadas anualmente [Caballero-Salcedo *et al.*, 1994]. Los índices de mortalidad colocan a la amibiasis como la tercer causa de muerte por parasitosis en todo el mundo, después de la malaria y la esquistosomiasis [WHO, 1997; Petri *et al.*, 2000].

Tabla 1. Especies de *Entamoeba* que infectan al intestino del hombre [Martínez-Palomo, 1998]

- *E. histolytica*
- *E. dispar*
- *E. coli*
- *E. hartmanni*

2.4.1. *Biología y ciclo de vida*

E. histolytica es un parásito cosmopolita de distribución mundial. Sin embargo, su incidencia aumenta en climas templados, así como en lugares donde las condiciones de salud e higiene son precarias [Martínez-Palomo y Espinoza-Castellano, 1988].

A pesar de que el hombre es el único y definitivo hospedante, el ciclo de vida de *E. histolytica* no ha sido estudiado en humanos [Martínez-Palomo, 1993]. La mejor descripción del ciclo está basada en estudios realizados en mono [Dobell, 1928], la cual ha sido extrapolada a humanos (Figura 9). Dos estadios morfológicamente distinguibles han sido

identificados, el quiste (forma infectiva) y el trofozoito (forma invasiva). La infección amibiana es adquirida mediante la ingestión de quistes maduros, a través de alimentos o bebidas contaminadas. La pared del quiste se debilita al pasar por el estómago y en el intestino delgado sufre un desenquistamiento, dando origen a un trofozoito tetranucleado. En este estadio, la amiba lleva a cabo otro ciclo de replicación nuclear seguido de tres ciclos de división celular, dando origen a ocho trofozoitos mononucleados, potencialmente invasivos. Estos, colonizan el intestino grueso y, ocasionalmente, penetran la mucosa intestinal e invaden otros órganos (p.e. hígado, pulmón, cerebro). El trofozoito mononucleado es amorfo y mide de 20-40 μm de diámetro. Como proceso alternativo de la división celular, el trofozoito puede enquistarse. Los factores que inducen el enquistamiento son desconocidos. El enquistamiento inicia con la aparición de cuerpos cromatóides en el citoplasma del trofozoito y la biosíntesis de una pared quitinosa. La maduración del quiste involucra dos ciclos de replicación nuclear sin división celular. Los quistes son excretados en heces y pueden ser infectivos hasta por varios meses. Quistes de 1, 2 y 4 núcleos pueden ser identificados en muestras fecales de individuos infectados. El quiste es redondo, mide de 8-20 μm de diámetro y contiene 4 núcleos cuando está maduro.

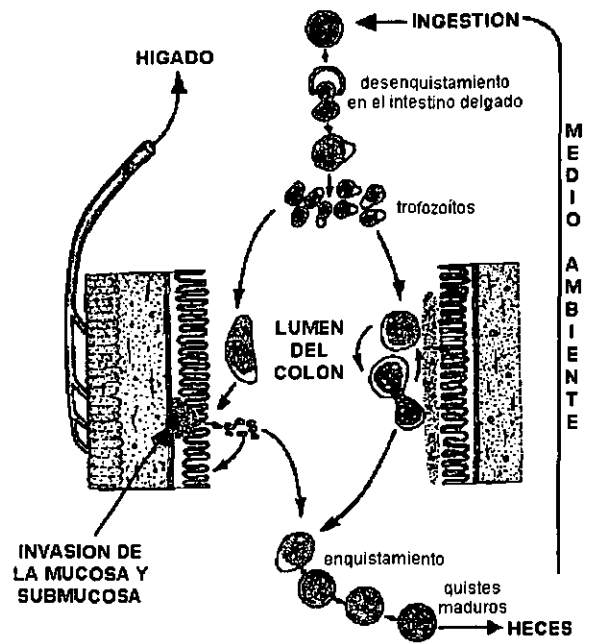


Figura 9. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

2.4.2. Morfología y organización estructural

El trofozoito de *E. histolytica* es bastante pleomórfico, logrando diámetros de hasta 60 μm , con continuos movimientos citoplasmáticos y de superficie, observándose pseudópodos, uroide y ocasionalmente filopodia. Además, suficiente actividad endocítica es reflejada a través de la gran variedad de hendiduras fagocíticas-pinocíticas y su alto contenido vesicular. *E. histolytica* es un eucariote unicelular estructuralmente simple, con una organización citoplasmática poco sofisticada. El trofozoito está caracterizado por un citoesqueleto poco estructurado, ausencia de organelos diferenciados (como mitocondria y

peroxisomas) y un sistema endomembranoso (equivalente al retículo endoplásmico y aparato de Golgi) poco desarrollado (Figura 10) [Martínez-Palomo, 1993].

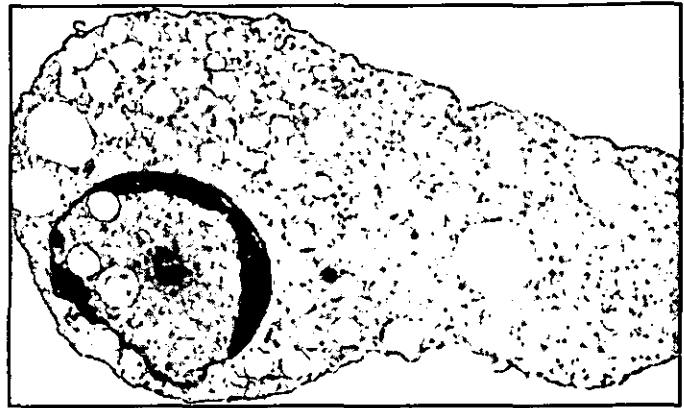


Figura 10. Microscopía electrónica de un trofozoito de *E. histolytica* (X2,500) [Martínez-Palomo, 1986].

2.4.3. Organización genética

Existen estudios genéticos que indican que la cromatina de *E. histolytica* está organizada en partículas parecidas a nucleosomas [Torres-Guerrero *et al.*, 1991]. El tamaño del genoma se calcula entre 2.2 y 3.7×10^8 kb [Bhattacharya *et al.*, 2000]. El DNA genómico está organizado en 11-20 cromosomas de tamaños entre 0.3 y 3.0 Mb [Valdés *et al.*, 1990]. El contenido de G+C en el genoma amibiano es de 22 %. En secuencias codificantes, el contenido de G+C es de 33%, con una preferencia A/T en la tercera posición de 82% [Tannich y Horstmann, 1992]. Los genes aparentemente están cercanos a otras secuencias codificantes, ya que los espacios intergénicos no exceden de 1.4 Kb [Petter *et al.*, 1992]. Las regiones 5' y 3' no codificantes de los RNA mensajeros son relativamente cortas [Bruchhaus *et al.*, 1993]. Los RNA ribosomales están codificados en secuencias extracromosomales circulares de 24.5 Kb, de las cuales existen aproximadamente 200 copias por célula y las evidencias sugieren que estas moléculas se replican de manera autónoma [Bhattacharya *et al.*, 1989; Hubber *et al.*, 1989].

2.4.4. Particularidades de eucariote atípico

E. histolytica ha sido considerada como una divergencia temprana de eucariota ya que, aunque presenta un núcleo, carece de algunos organelos típicos de células eucariotas (p.e. mitocondria) y presenta un metabolismo poco común. Sin embargo, los árboles filogenéticos basados en el RNA ribosomal colocan a *E. histolytica* dentro de una ramificación más reciente [Cavalier-Smith, 1993]. Esta última postura ha sido apoyada por estudios en los que se han identificado proteínas de *E. histolytica*, tales como piridín nucleótido transhidrogenasa (PNT) [Clark *et al.*, 1995], chaperonina 60 mitocondrial (cpn60) [Tovar *et al.*, 1999], y HSP70 mitocondrial [Bakatselou *et al.*, 2000], que usualmente están localizadas en la mitocondria de otras células eucariotas, aportando evidencia directa de una pérdida secundaria de este organelo. Estos últimos datos apuntan hacia la hipótesis de

algunos investigadores, que consideran que las características de *E. histolytica* como célula eucariota atípica son el producto de la evolución de este protozoario hacia el parasitismo entérico y la anaerobiosis, y no debido a una ausencia de algunos organelos.

2.4.5. Patogenicidad y factores de virulencia

En humanos, los trofozoitos de *E. histolytica* pueden invadir el epitelio del colon y producir úlceras y disentería. Este proceso invasivo puede avanzar progresivamente y conducir a una amibiasis extraintestinal. En otras palabras, *E. histolytica* es un parásito de características patógenas que exhibe un amplio rango de virulencia. La invasión parasitaria es un proceso activo, mediado por trofozoitos, del cual se pueden distinguir varias etapas: (1) adhesión a la mucosa intestinal; (2) muerte celular mediada por contacto y actividad enzimática; (3) disrupción de la pared intestinal; y (4) transporte a través del sistema vascular [Das *et al.*, 1999; Espinoza-Castellano y Martínez-Palomo, 2000]. La Tabla 2 enlista algunos de los factores que participan en la adherencia, citotoxicidad y lesión de tejidos, importantes para la patogenia y virulencia de *E. histolytica*.

Factores de adherencia. La adhesión del parásito depende primordialmente de la unión de su lectina de 170 kDa a residuos de galactosa, o N-acetil-galactosamina, presentes en glicoproteínas de la célula blanco [Petri *et al.*, 1989]. Otras moléculas involucradas en este proceso son una lectina de 220 kDa [Rosales-Encina *et al.*, 1989], una adhesina de 112 kDa [Arroyo *et al.*, 1987] y un fosfolipoglicano de superficie [Stanley *et al.*, 1992].

Actividad enzimática y citólisis. Una vez que *E. histolytica* ha establecido contacto con la célula blanco, inmediatamente suceden una serie de eventos citolíticos derivados de su actividad enzimática [Gitler y Mirelman, 1986]. Varias actividades enzimáticas han sido identificadas en este parásito: cisteín proteasas [Perez-Montfort *et al.*, 1987], colagenasa [Muñoz *et al.*, 1984], fosfolipasa A [Ravdin *et al.*, 1985] y péptidos formadores de poro o amibaporos [Leippe *et al.*, 1991]. A pesar de que la actividad citolítica del amibaporo no ha sido comprobada, y que la participación de las diferentes proteasas durante las infecciones *in vivo* está por ser

Tabla 2. Factores de virulencia de *E. histolytica* [Das, 1999; Espinoza-Castellano, 2000].

Adherencia a células del blanco

- Lectina de 170 kDa de unión a Gal/NAc-Gal
- Otras moléculas de adhesión como la lectina 220 kDa, la adhesina de 112 kDa y un fosfolipoglicano

Citolisis dependiente de contacto

- Amibaporo
- Cisteín-proteasas
- Colagenasa
- Fosfolipasa A

demostrada, *E. histolytica* cuenta con la maquinaria molecular necesaria para degradar la mucosa del colon, durante la amibiasis intestinal [Espinoza-Castellanos y Martínez-Palomo, 2000].

2.4.6. Compartimentalización y marcadores moleculares de tráfico intracelular

Además de las evidencias moleculares de la presencia de un compartimiento subcelular equivalente a la mitocondria, denominado *crypton* o mitosoma, existen estudios citoquímicos y bioquímicos que sugieren la presencia de equivalentes funcionales al retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Tabla 4). Por otro lado, han sido clonados varios genes que codifican para proteínas homólogas a componentes moleculares del tráfico intracelular en otros eucariotas: SRP54, componente del complejo SRP que participa en el mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal [Ramos *et al.*, 1997b]; BIP, proteína residente del RE que funciona como chaperona durante el plegamiento de polipéptidos nacientes [Gosh *et al.*, 1999]; PDI, enzima encargada en la formación de puentes disulfuro [Ramos *et al.*, 2000]; STT3, componente del complejo oligosacariltransferasa que participa en N-glicosilación [Gutiérrez *et al.*, 2000]; Sec61, componente del canal de translocación de proteínas a través de la membrana del RE [Sanchez-Lopez *et al.*, 2000]; ERD2, receptor de *cis*-Golgi que participa en el transporte retrógrado de proteínas residentes del RE [Sanchez-Lopez *et al.*, 1998]; Rab7, Rab11, RabA [Temesvari *et al.*, 1999], RabB [Rodríguez *et al.*, 2000], Rab5 [Saito-Nakano *et al.*, 2000], y Rab8 [Juárez *et al.*, 2000], GTPasas de bajo peso molecular involucradas en el tráfico vesicular. Afortunadamente, el proyecto de secuenciación del genoma de *E. histolytica* ha sido iniciado, por lo que la lista de homólogos disponibles para experimentación genética, bioquímica y celular aumentará; de tal manera que, las características moleculares y celulares de *E. histolytica*, incluyendo la compartimentalización, podrán ser estudiadas con mayor profundidad.

Tabla 3. Avances en el estudio de la compartimentalización de *E. histolytica*

• Citoquímica de aparato de Golgi y retículoendoplásmico con DiOC6 y C6-NBD-ceramida	Mazzuco <i>et al.</i> , 1997
• Estudios de actividades bioquímicas de N-glicosilación: GPT (N-acetil-glucosamina-1P-transferasa) y GT (N-acetil-glucosamina-transferasa) y DPMS (dolicol fosfato manosa sintasa)	Vargas-Rodríguez <i>et al.</i> , 1998 Villagomez-Castro <i>et al.</i> , 1998
• Caracterización de vesículas de endocitosis y secreción. Localización intracelular de Rab's	Gosh <i>et al.</i> , 1999; Temesvari <i>et al.</i> , 1999

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar, clonar y caracterizar el gen que codifica para la proteína SRP54 de *Entamoeba histolytica* y determinar su distribución intracelular en el estadio de trofozoíto.

Objetivos específicos

- (1) Aislar el gen que codifica para la proteína SRP54 de *E. histolytica*.
- (2) Determinar la secuencia nucleotídica, y polipeptídica deducida, del gen *EhSRP54*.
- (3) Determinar el número de copias del gen SRP54 presentes en el genoma de *E. histolytica*.
- (4) Determinar el tamaño del transcrito y de las regiones no traducidas de *EhSRP54*.
- (5) Expresar la proteína *EhSRP54* recombinante en *E. coli* y purificarla a partir de lisados bacterianos.
- (6) Producir anticuerpos policlonales anti-*EhSRP54* e inmunopurificarlos usando a la proteína recombinante como inmunoabsorbente.
- (7) Identificar la proteína SRP54 en lisados totales de *E. histolytica*.
- (8) Determinar la localización intracelular de la proteína SRP54 en trofozoítos de *E. histolytica*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Células

Las cepas XL1-Blue (Stratagene) y DH5 α (Gibco BRL) fueron utilizadas rutinariamente para técnicas de biología molecular. Para la infección con bacteriófago λ se usó la cepa XL1-Blue F' (células que expresan el pili F' y el receptor *lamB*). La cepa M15 (QIAGEN) fue utilizada para la expresión de proteínas recombinantes.

Las bacterias competentes tanto para transformación por choque térmico como para infección con bacteriófago λ fueron preparadas de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. Los cultivos bacterianos fueron preparados utilizando el medio Luria-Bertani.

Los trofozoitos de la cepa HK9 de *E. histolytica* fueron cultivados axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 [Diamond *et al.*, 1978]. Cultivos de 200 mL fueron utilizados para la purificación de ácidos nucleicos; mientras que, para la preparación de lisados proteicos totales e inmunofluorescencia se utilizaron cultivos de 10 mL. Los trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento (48 h) fueron cosechados mediante centrifugación a 500 Xg durante 10 min a 4°C.

4.2. Radiomarcaje de la sonda

Un fragmento de 440 pb, específico para el gen SRP54 de *E. histolytica*, fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos SP6 y T7 y el plásmido pGEM-4Z/SRP54 como molde. Se preparó un mezcla conteniendo 10 ng de DNA plasmídico, 4 μ M de oligonucleótido SP6 [5'- GGA TTT AGG TGA CAC TAT AG -3'], 4 μ M de oligonucleótido T7 [5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'], 10 mM Tris-HCl (pH 8.85), 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 200 μ M de deoxinucleótidos y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Boehringer-Mannheim) en un volumen final de 50 μ L. La amplificación se realizó mediante 30 ciclos [1 min a 94°C, 1 min a 42°C, 1 min a 72°C] y 1 ciclo [7 min a 72°C].

El producto amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 μ g/mL EtBr y purificado a partir de agarosa usando el estuche comercial *Gene Clean*[®] (BIO 101). 50 ng del producto de PCR purificado fueron radiomarcados usando [α -³²P]-dCTP (Amersham International) y el estuche comercial *Random Priming Extension*[®] (New England Nuclear) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor.

4.3. Tamizado del banco genómico

El banco genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS (λ ZAP-*Eh*DNA) fue construido y proporcionado por el Dr. Ruy Pérez-Monfort (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) [Saavedra-Lira y Pérez-Monfort, 1994]. Brevemente, el DNA genómico de *E. histolytica* fue digerido con la endonucleasa *Eco*RI, purificado y ligado a los brazos del bacteriofago λ (que contiene los adaptadores *Eco*RI). Los bacteriófagos recombinantes fueron empaquetados y amplificados siguiendo los protocolos proporcionados por el proveedor (Stratagene).

Se analizaron 1×10^5 unidades formadoras de placas (ufp) mediante la técnica de hibridación en placa de lisis [Sambrook *et al.*, 1989;]. El tapete de placas líticas fue preparado infectando 600 μ L de *E. coli* XL1-Blue F' (A_{600} de 0.6 - 0.8) con 2×10^4 ufp durante 15 min a 37°C. Las células infectadas fueron crecidas, en cajas Petri con medio NZY, durante la noche a 37°C. Las placas de lisis, generadas en 5 cajas, fueron transferidas a membranas de Nitrocelulosa S&S NC[®] (Schleicher & Schuell) durante 2 min y 4 min (duplicado). Las membranas fueron tratadas durante 2 min en solución de desnaturalización [1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH], seguidos de 5 min en solución de neutralización [1.5 M NaCl; 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)] y durante 30 segundos en solución de lavado [0.2 M Tris-HCl (pH 7.5); 2X SSC]. Finalmente, las placas de lisis fueron fijadas durante 2 h a 80°C y 15 mmHg.

Las membranas fueron incubadas durante 16 h a 42°C en 50 mL de solución de hibridación [50% formamida; 1X Denhardt's; 5X SSC; 25 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5); 1% SDS] conteniendo 2.5×10^7 cpm de la sonda radioactiva y 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmón. Posteriormente, fueron lavadas en serie durante 20 min con las soluciones: 2X SET [50 mM NaCl; 3 mM Tris-HCl (pH 7.4); 0.2 mM EDTA] a temperatura ambiente; 2X SETS [2X SET; 0.1% SDS] a 42°C; 2X SETS a 55°C; y 2X SET a temperatura ambiente. Las membranas fueron expuestas en pantallas de *Phosphorimager*[®] (Molecular Dynamics) y reveladas después de 4 días, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las placas de lisis con alta señal de hibridación (o clonas positivas) fueron seleccionadas de la caja Petri original y resuspendidas en 1 mL de solución SM [100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 0.01% gelatina; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)]. Las clonas positivas fueron aisladas y purificadas mediante dos rondas de infección-transferencia-hibridación, lográndose obtener clonas puras. Estas fueron tituladas y almacenadas en solución SM a 4°C. La clona purificada denominada λ ZAP/22-1 fue seleccionada, por su alta señal de hibridación, para aislar el gen SRP54 de *E. histolytica*.

4.4. Clonación de la secuencia genómica

El inserto de clona positiva λ ZAP/22-1 fue amplificado por PCR largo, usando la mezcla enzimática *eLONGasa*[®] (Gibco BRL). Una mezcla conteniendo 200 μ M de deoxinucleótidos, 450 nM de los oligonucleótidos KS (5' - CGA GGT CGA CGG TAT CG -

3') y SK (5'- GCT CTA GAA CTA GTG GAT C -3'), 60 mM Tris-SO₄ (pH 9.1), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 1.6 mM MgSO₄, 2.5 x 10⁷ ufp y 2 U de *eLONGasa*, fue preparada en un volumen final de 50 µL. La amplificación fue realizada en un termociclador *Robocycler*[®] (Stratagene) utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo [2 min a 94°C], 30 ciclos [30 seg a 94°C; 30 seg a 45°C; 6 min a 68°C] y, 1 ciclo [7 min a 68°C]. El producto obtenido fue analizado mediante electroforesis en gel de 0.8% agarosa - 0.5 µg/mL EtBr. El inserto observado fue de 7 kb de largo (denominado 22-1).

Para reducir el tamaño de la secuencia que contenía al gen *EhSRP54*, el inserto 22-1 fue digerido con las endonucleasas *AccI*, *BamHI*, *ClaI* y *PstI* (Boehringer-Mannheim). Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 µg/mL EtBr y, posteriormente, transferidos a una membrana de Nylon *Hybon N+* (Amersham International). La membrana fue incubada con la sonda radioactiva de 440 pb siguiendo el protocolo estándar de hibridación tipo Southern [Sambrook, 1989]. Un fragmento de 2.3 kb, producto de la digestión con *ClaI*, fue identificado. A partir de una digestión preparativa, el fragmento de 2.3 kb fue purificado a partir de agarosa usando el estuche comercial *Gene Clean*[®] (BIO 101). Este fragmento fue subclonado mediante ligación en el sitio *ClaI* del vector pBluescript SK- (Stratagene) usando la enzima T4 DNA ligasa (Boehringer-Mannheim), obteniéndose el plásmido pBEhSRP54. Todo el inserto 22-1 fue subclonado y analizado en otro proyecto del laboratorio.

4.5. Secuenciación de DNA

Los fragmentos de DNA genómico de *E. histolytica* fueron secuenciados mediante el método de dideoxinucleótidos terminadores de la síntesis de cadena [Sanger *et al.*, 1977]. Los estuches comerciales *fmol*[®] (Promega Corp.) o *ThermoSequenasa*[®] (Amersham International) fueron utilizados rutinariamente para la secuenciación de DNA. Los plásmidos que portan los fragmentos de DNA amibiano fueron purificados por el método de lisis alcalina [Birnboim *et al.*, 1983]. Las reacciones se realizaron siguiendo los protocolos recomendados por los proveedores. Ambas cadenas del DNA fueron obtenidas mediante la estrategia de caminado sobre secuencia o "*primer walking*" utilizando oligonucleótidos sintéticos (Operon Technologies, Inc.; Bio-Synthesis, Inc.; Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos / IBT-UNAM) (Tabla 5).

4.6. Análisis de secuencia y homología

La secuencia nucleotídica fue analizada usando los programas *Sequencing Project* y *DNA Alignment* del paquete *GeneWorks*[®] 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.) para Mac y el programa *CODONPREFERENCE* del paquete GCG (Wisconsin) para Unix. Los oligonucleótidos sintéticos fueron diseñados con ayuda del programa *OLIGO*[®] 4.03 (National Biosciences,

Tabla 4. Oligonucleótidos sintéticos utilizados durante la secuenciación de *EhSRP54*

Nomenclatura	Secuencia (5' - 3')	Localización
FW	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	MCS pBluescript SK-
KS	CGA GGT CGA CGG TAT CG	MCS pBluescript SK-
RV	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	MCS pBluescript SK-
SK	GCT CTA GAA CTA GTG GAT C	MCS pBluescript SK-
SRP_3' LW	TTC TCT TAT ATC TCT ACC AC	1248-1267 <i>EhSRP54</i>
SRP_3' LW2	TCT CTT ACT GTT AAT GTA CC	1010-1029 <i>EhSRP54</i>
SRP_3' UP	GGG AGA TTT AAA AGG CAT AG	925-944 <i>EhSRP54</i>
SRP_3' UP2	ACA GAT AGA GAA TTA GAT GG	1172-1191 <i>EhSRP54</i>
SRP54.3PR	CAA AGA ATG CTT CCT AAA GG	1394-1413 <i>EhSRP54</i>
SRP54.PREX	CGT ATT AAT AAC TTC TTC ATC TAC AAC	98-124 <i>EhSRP54</i>
SRPL118	CTA GCA ACT TTT ACT GG	536-552 <i>EhSRP54</i>
SRPL212b	TAT ATC ATT TTT TTC CTT TC	573-592 <i>EhSRP54</i>
SRPU270	TTT TGT AAT GGA TGG AG	688-704 <i>EhSRP54</i>
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	MCS pBluescript SK-

Inc.) para Mac. Las construcciones *in silico* de los plásmidos fueron realizados usando el programa *Gene Construction Kit*[®] 1.03.1 (Textco, Inc.) para Mac. La secuencia nucleotídica fue traducida usando el programa *Translate* del paquete *GeneWorks*[®] 2.5.1 y la secuencia polipeptídica deducida fue analizada mediante los programas de la sección *Proteomics tools* del servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, www.expasy.ch).

La búsqueda de homologías en bases de datos se realizó usando el programa BLAST [Altschul *et al.*, 1990] en el servidor NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov). Las comparaciones de secuencias polipeptídicas en pares se llevo a cabo usando el programa *Protein Alignment* del paquete GENEWORKS[®] 2.5.1. y/o el programa BLAST2 [Tatusova *et al.*, 1999] en el servidor NCBI. Todas las búsquedas y comparaciones fueron realizadas utilizando los valores preestablecidos de inserción. La matriz de identidades/similitudes fue obtenida usando el programa ClustalX 1.81 [Thompson *et al.*, 1997] para Mac y visualizada con el programa MacBoxshade 2.15 [dominio público].

4.7. Southern blot

El DNA genómico fue aislado y purificado a partir de un paquete celular proveniente de 8 botellas de cultivo (aproximadamente 8×10^7 trofozoitos). El paquete se resuspendió y fue lisado con Triton X-100 (BIORAD) en 7.5 mL de solución de cloruro de litio [2.5 M LiCl; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 62.5 mM EDTA (pH 8.0); 4% Tritón X-100]. Los ácidos nucleicos fueron aislados mediante una extracción con 7.5 mL de fenol-cloroformo (1:1) seguida de una extracción con 7.5 mL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa de la última extracción fue mezclada con 15 mL de etanol absoluto frío y los ácidos nucleicos fueron precipitados mediante centrifugación a 11,500 Xg durante 20 min. La

pastilla de DNA fue lavada con 10 mL de 70% etanol y resuspendida en 1 mL de TE. Para eliminar el RNA, la solución fue tratada durante 1 h con 100 µg de ribonucleasa A (Sigma Chemicals). El DNA genómico fue purificado en gradiente de cloruro de cesio mediante ultracentrifugación a 100,000 rpm durante 9 h a 22°C. La extracción se realizó siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. La integridad del DNA fue analizada mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 µg/mL Et Br y se determinó su concentración por un método fluorométrico utilizando YOPRO-1 (Molecular Probes).

Porciones de 4 µg de DNA genómico fueron digeridos con las endonucleasas *AccI*, *EcoRI*, *HindIII* y *SmaI* (Boehringer-Mannheim) durante la noche a temperaturas de digestión óptimas. Los fragmentos de DNA fueron separados en gel de agarosa al 1.2% - 0.5 µg/mL EtBr. Previo a la transferencia, el DNA fue depurinado durante 20 min en 0.25 M HCl y desnaturalizado en 0.4 M NaOH durante 30 min. Los fragmentos de DNA fueron transferidos durante la noche a una membrana de Nylon *Hybond N+* (Amersham International) utilizando como solución de transferencia 0.4 M NaOH. El sistema de transferencia fue montado de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. La membrana fue lavada durante 10 min con solución de neutralización [0.2 M Tris-HCl pH 7.5-8.0; 0.1X SSC; 0.5% SDS]. El DNA fue fijado a la membrana utilizando un ciclo estándar de *Stratalinker*[®] (Stratagene). La membrana fue incubada durante la noche a 42°C en 15 mL de solución de hibridación [50% formamida; 5X Dendhart's; 5X SSC; 0.2% SDS; 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5)] conteniendo 1.5 x 10⁷ cpm de la sonda de 440 pb radioactiva y 100 µg/mL de DNA de esperma de salmón. Posteriormente, la membrana fue lavada en cuatro ocasiones con solución de baja astringencia [2X SSC; 0.1% SDS] durante 5 min a temperatura ambiente; seguida de 2 lavados en solución de alta astringencia [0.1X SSC; 0.1% SDS] durante 30 min a 55°C. Finalmente, la membrana fue expuesta en un estuche de autoradiografía con una película X-OMAT[®] (Kodak) a -70°C durante 96 h. La película fue revelada usando los reactivos y el protocolo sugeridos por el proveedor.

4.8. Northern blot

El RNA total fue aislado y purificado a partir del paquete celular proveniente de 8 botellas de cultivo (aproximadamente 80 x 10⁶ trofozoitos). El paquete se resuspendió en 10 mL de TRIzol[®] (Gibco BRL) y la lisis se realizó mediante agitación en vórtex durante 1 min. El lisado se mantuvo a 4°C durante la noche. El RNA fue extraído usando 10 mL de cloroformo y centrifugado a 12,000 Xg durante 10 min a 4°C, seguido de una precipitación alcohólica, usando un volumen de isopropanol, mediante centrifugación a 12,000 Xg durante 10 min a 4°C. La pastilla de RNA fue lavada con 10 mL de 75% etanol y resuspendida en 2 mL de 0.1% dietilpirocarbonato. La integridad del RNA fue analizada en gel de 1.2% agarosa - 2.2 M formaldehído y teñido en una solución 0.5 µg/mL de EtBr. La concentración

fue determinada mediante A_{260} . El RNA poliadenilado fue purificado mediante cromatografía de afinidad usando oligo-(dT)-celulosa (Sigma Chemicals). La columna de afinidad fue preparada resuspendiendo 0.5 g de oligo-(dT)-celulosa en 1 ml de 0.1 N NaOH. Esta suspensión fue transferida a una columna de cromatografía y lavada con 3 vol de 0.1% dietilpírocarnonato y 5 vol de solución 1X de pegado [20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.5 M LiCl; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.1% SDS]. El RNA total fue desnaturalizado a 65°C durante 15 min y mezclado con un vol de solución 2X de pegado. El RNA total desnaturalizado fue aplicado a la columna y el efluente fue recromatografiado una vez más. El RNA no poliadenilado fue colectado y la columna fue lavada con 10 vol de solución 1X de pegado y 5 vol de solución de lavado [20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.1 M LiCl; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.1% SDS]. El RNA poliadenilado fue separado con 5 vol de 2 mM EDTA y colectado en fracciones de 500 μ L. Las fracciones de mayor A_{260} fueron seleccionadas. Los RNAs fueron precipitados con 2.5 vol de etanol absoluto en presencia de 0.18 M NaCl, durante la noche a -20°C. La integridad del RNA fue analizada en gel de 1.2% agarosa - 2.2 M formaldehído y teñido con una solución de 0.5 μ g/mL de EtBr. La concentración fue determinada mediante A_{260} .

1 μ g de cada RNA (poliadenilado y no poliadenilado), disueltos en 2.2 M formaldehído y 50% formamida, fueron separados mediante electroforesis en gel de 1.2% agarosa - 2.2 M formaldehído. El gel fue lavado con 0.1% dietilpírocarnonato y equilibrado en 10X SSC durante 40 min. El RNA fue transferido por capilaridad a una membrana *Hybond N+* (Amersham International) usando 10X SSC como solución de transferencia, durante la noche. El sistema de transferencia fue montado de acuerdo a protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 1989]. La membrana fue lavada en 6X SSC y el RNA fue fijado mediante un pulso estándar en el *Stratalinker*[®] (Stratagene). La membrana fue incubada durante 72 h a 42°C en solución de hibridación [50% formamida; 5X Dendhart's; 5X SSC; 0.2% SDS; 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6.5)] utilizando el fragmento de 440 pb como sonda radioactiva en una relación de 3 x 10⁶ cpm por mL de solución. Posteriormente, la membrana fue lavada en 4 ocasiones con solución de baja astringencia [2X SSC; 0.1% SDS] durante 5 min a temperatura ambiente; seguida de 2 lavados en solución de alta astringencia [0.1X SSC; 0.1% SDS] durante 30 min a 55°C. Finalmente, la membrana fue expuesta en una pantalla de *Phosphorimager*[®] (Molecular Dynamics) y revelada 48 h después siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.9. Amplificación rápida del extremo 3' del DNA complementario (3'-RACE)

500 ng de RNA total fueron utilizados para la síntesis de cDNA. La retrotranscripción fue realizada usando 200 U de la enzima *SuperScript II RT*[®] (Gibco-BRL) en una mezcla de reacción conteniendo 500 nM de oligonucleótido AP [5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT (T)₁₆-3'], 500 μ M de deoxinucleótidos, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM DTT, 20 mM Tris-

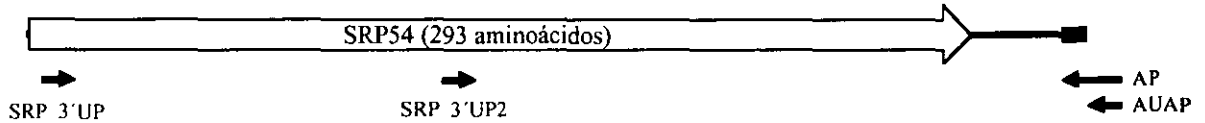


Figura 11. Representación esquemática de la determinación del extremo 3' del DNA complementario de *EhSRP54*. Localización realtiva de los oligonucleótidos utilizados durante las ampliificaciones del 3'RACE. La flecha indica la orientación de la transcripción del gene *EhSRP54* y los aminoácidos correspondientes al extremo carboxilo terminal.

HCl (pH 8.4) y 50 mM KCl en un volumen final de 20 μ L. La reacción se realizó durante 50 min a 42°C. El RNA de las moléculas híbridas fue digerido usando 1U de la enzima Ribonucleasa H (Gibco-BRL) durante 20 min a 37°C.

2 μ L del cDNA fueron utilizados para amplificar el extremo 3' del transcrito *EhSRP54* usando 200 nM de oligonucleótido AUAP [5'- GGA TCC GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'], 200 nM de oligonucleótido SRP_3'UP [5'- GGG AGA TTT AAA AGG CAT AG -3'], 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de deoxinucleótidos y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Gibco-BRL) en un volumen final de 50 μ L. La amplificación se realizó mediante 1 ciclo [2 min a 94°C], 30 ciclos [1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C] y 1 ciclo [10 min a 72°C]. Una amplificación anidada fue realizada usando como cadena molde 2 μ L del PCR anterior, 200 nM de los oligonucleótidos AUAP y SRP_3'UP2 [5'- ACA GAT AGA GAA TTA GAT GG -3'] y las mismas condiciones de reacción. Las ampliificaciones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 μ g/mL EtBr. La Figura 11 esquematiza la posición relativa de los oligonucleótidos usados durante la amplificación del extremo 3' del cDNA de *EhSRP54*.

El producto obtenido fue reparado y fosforilado con las enzimas Klenow y T4 DNA polinucleótido cinasa (Boehringer-Mannheim) y, posteriormente, clonado en el vector pBluescript SK- (Stratagene) en el sitio *Sma*I. El extremo 3' no traducido fue analizado mediante secuenciación con el oligonucleótido SRP54.3PR [5'- CAA AGA ATG CTT CCT AAA GG -3'].

4.10. Amplificación rápida del extremo 5' del DNA complementario (5'-RACE)

El cDNA fue obtenido a partir de 500 ng de RNA total. La retrotranscripción fue realizada usando 200 U de la enzima *SuperScript II RT*[®] (Gibco-BRL), en una mezcla de reacción conteniendo 500 nM de oligonucleótido SRPL212b [5'- TAT ATC ATT TTT TTC CTT TC -3'], 500 μ M de deoxinucleótidos, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) y 50 mM KCl en un volumen final de 20 μ L. La reacción se realizó durante 50

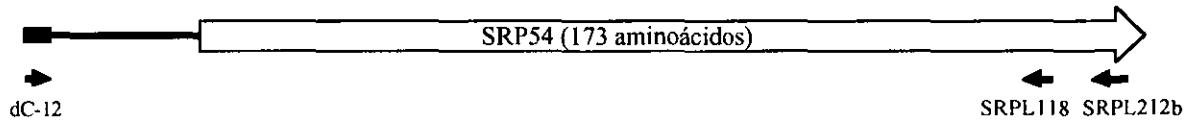


Figura 12. Representación esquemática de la determinación del extremo 5' del DNA complementario de *EhSRP54*. Localización reactiva de los oligonucleótidos utilizados durante las amplificaciones del 5'RACE. La flecha indica la orientación de la transcripción del gene *EhSRP54* y los aminoácidos correspondientes al extremo amino terminal.

min a 42°C. El RNA de las moléculas híbridas fue digerido usando 1 U de Ribonucleasa H (Gibco-BRL) durante 20 min a 37°C. El cDNA fue limpiado usando una columna de *Sephadex G50* (Sigma Chemicals) y precipitado con 2.5 vol de etanol en presencia de 150 µg/mL de glicógeno y 0.3 M acetato de sodio (pH 5.2). El cDNA fue resuspendido en un 6 µL de agua tetradestilada.

Residuos dG fueron incorporados al extremo 3' del cDNA usando la enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (TdT, Gibco-BRL). La reacción se realizó usando 5 µL de cDNA, 100 µM de dGTP (Boehringer-Mannheim), 100 µM de cacodilato de potasio (pH 7.2), 1 mM de CoCl₂, 100 µM de DTT y 1 U de TdT en un volumen final de 10 µL. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C, seguida de inactivación de la enzima a 70°C durante 5 min. El cDNA-3'dG fue precipitado con 2.5 vol de etanol en presencia de 1 mg/mL de glicógeno y 0.3 M acetato de sodio. El cDNA modificado fue resuspendido en 10 µL de agua tetradestilada.

2 µL de cDNA fueron utilizados para amplificar el extremo 3' del transcrito usando 300 nM de oligonucleótido dC12 [5' - (C)₁₂ -3'], 300 nM de oligonucleótido SRPL212b, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxinucleótidos y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Boehringer-Mannheim) en un volumen final de 50 µL. Los ciclos de amplificación fueron: 1 ciclo [2 min a 94°C]; 30 ciclos [1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C]; 1 ciclo [7 min a 72°C]. Una amplificación anidada fue realizada usando como cadena molde 2 µL del PCR anterior, 300 nM de los oligonucleótidos dC-12 y SRPL118 [5' - CTA GCA ACT TTT ACT GG -3'] y las mismas condiciones de reacción. Las amplificaciones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 µg/mL EtBr. La Figura 12 esquematiza la posición relativa de los oligonucleótidos usados durante la amplificación del extremo 5' del cDNA de *EhSRP54*.

El producto obtenido fue reparado y fosforilado con las enzimas Klenow y T4 DNA polinucleótido kinasa (Boehringer-Mannheim) y, posteriormente, clonado en pBluescript SK- (Stratagene) en el sitio *Sma*I. El extremo 5' no traducido fue analizado mediante

secuenciación con el oligonucleótido PREX.SRP54 [5'- CGT ATT AAT AAC TTC TTC ATC TAC AAC -3'].

4.11. Inferencia filogenética

Las secuencias polipeptídicas de proteínas SRP54 de nueve eucariotas, nueve eubacterias, dos arqueobacterias, un homólogo de cloroplasto, fueron utilizadas junto con la secuencia ambiana para realizar un análisis filogenético preliminar [Ramos *et al.*, 1997]. El alineamiento múltiple fue obtenido usando el programa ClustalW 1.7 [Thompson, 1994] para Mac y; posteriormente, editado manualmente para eliminar remociones o inserciones que pudieran ocasionar una desviación en los resultados. Los árboles filogenéticos basados en este alineamiento fueron inferidos, usando los algoritmos de máxima parsimonia y de matriz de distancias, mediante los programas PROTPARS, PROTDIST, NEIGHBOR y FITCH del paquete PHYLIP 3.572 [Felsenstein, 1989] para Mac. El valor de cada nodo fue analizado mediante 100 replicas. El análisis de las replicas fue realizado usando los programas SEQBOOT y CONSENSE del paquete PHYLIP 3.572. Los árboles fueron visualizados usando el programa TREEVIEW [Page, 1996] para Mac.

Un alineamiento múltiple más robusto, de la familia de proteínas SRP54, fue realizado utilizando secuencias obtenidas de la base de datos SRPDB (psyche.uthct.edu/dbs/SRPDB/SRPDB.html) [Gorodkin, 2001]. El alineamiento fue realizado usando el programa *ClustalX* 1.81 [Thompson *et al.*, 1997] para Mac. Posteriormente, el árbol filogenético fue inferido usando una matriz de distancias y el algoritmo *neighbor-joining* [Saitou y Nei, 1987], excluyendo posiciones con remociones o inserciones significativas, que pudieran ocasionar una desviación en los resultados. El valor de cada nodo fue estimado mediante un análisis de 1000 replicas. El árbol fue visualizado usando el programa TREEVIEW [Page, 1996] para Mac.

4.12. Predicción de estructura secundaria y modelo tridimensional

La predicción de estructura secundaria fue obtenida usando el programa PHDsec [Rost, 1994] en el servidor EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html). Para el modelamiento de proteínas basado en homología, se usó el programa de predicción automática SWISS-MODEL (www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html) [Guex, 1997]. El modelo obtenido fue verificado por el programa WHAT_CHECK (www.sander.embl-heidelberg.de/whatcheck) [Hooft, 1997] y visualizado usando los programas RASMOL[®] 2.6 (Biomolecular Structure Group - Glaxo Research and Development) [Sayle, 1995] y SwissPDBViewer[®] 3.7b2 [Guex, 1997] para Mac.

4.13. Expresión y purificación de la proteína recombinante

La secuencia codificante del gen *EhSRP54* fue amplificada usando 300 nM de los oligonucleótidos SK y SRPNH2. BamHI [5'- GCG GGA TCC CAA CTT GGG TCA AGT - 3'], 200 µM de deoxinucleótidos, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 5 ng de pBEhSRP54 y 2.5 U de enzima Taq DNA polimerasa en un vol final de 50 µL. La reacción se realizó en un termociclador *Robocycler*[®] usando las siguientes condiciones: 1 ciclo [2 min a 94°C], 30 ciclos [1 min a 94°C; 1 min a 42°C; 1.5 min a 72°C], y [7 min a 72°C]. El producto amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de 1% agarosa - 0.5 µg/mL EtBr, digerido con las enzimas *BamHI* y *HindIII* (BM / Roche) y purificado a partir de agarosa usando el estuche *Gene Clean*[®]. Este fragmento fue clonado en el vector pQE30 (QIAGEN) digerido en los sitios *BamHI-HindIII*, usando la enzima T4 DNA ligasa (BM / Roche). Esta ligación fue utilizada para transformar *E. coli* XL1 Blue competentes. Los transformates fueron analizados por el método de hibridación en colonia [Grunstein y Hogness, 1975]. El plásmido para expresar *EhSRP54* en bacterias, pQH54, fue aislado de una transformante, purificado usando el método de lisis alcalina [Birnboim et al., 1983] y caracterizado mediante un análisis de restricción con endonucleasas.

pQH54 fue utilizado para transformar *E. coli* M15 competentes. Las bacterias transformadas plaqueadas en medio LB agar suplementado con antibióticos MAK [80 µg/mL de meticilina, 20 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de kanamicina (Sigma Chemicals)] e incubadas a 37°C durante la noche. Los niveles de expresión de la proteína recombinante H54 (*EhSRP54* etiquetada con un hexámero de histidinas en el extremo amino terminal) fue analizada en mini-preparaciones de lisados bacterianos totales, siguiendo protocolos estándar de laboratorio [Sambrook et al., 1989].

50 mL de medio líquido LB - MAK fueron inoculados con 50 µL de *E. coli* - pQH54 en suspensión (15 % glicerol) e incubados a 37°C durante la noche, con agitación (200 rpm). 1 L de medio líquido LB - MAK fue inoculado con los 50 mL de cultivo joven e incubado a 37°C, con agitación, durante 1.5 h (A_{600} de 0.6 - 0.8). Para inducir la expresión, se añadió IPTG (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mM. Después de 4 h a 37°C y 200 rpm, el cultivo fue transferido a hielo y centrifugado a 5,000 rpm durante 20 min a 4°C. La pastilla bacteriana, de aproximadamente 2 g de peso húmedo, fue resuspendida en 10 mL solución de lisis-pegado [8M urea; 100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM NaH₂PO₄ (pH 8.0); 10 mM imidazol]. La lisis fue realizada mediante agitación tipo vórtex durante 2 min. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C.

La proteína H54 fue purificada por cromatografía de afinidad a metales. El lisado fue mezclado con 3 mL de 50% Ni-NTA-agarosa (QIAGEN) y acoplado a temperatura ambiente durante 30 min. La resina fue transferida a una columna de cromatografía y lavada con 5 vol de solución de lavado [8 M urea; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; NaH₂PO₄, pH 8.0; 20 mM

imidazol]. La proteína H54 fue eluída con 2 vol de solución de elución [8 M urea; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; NaH₂PO₄, pH 8.0; 250 mM imidazol]. El grado de pureza fue analizado mediante electroforesis en gel de 12.5% SDS-poliacrilamida [Laemmli, 1970] y teñidos con azul brillante Coomassie. La concentración de la proteína fue cuantificada por A₂₈₀ (1 U de A₂₈₀ es equivalente a 1 mg/mL de proteína). Para la producción y valoración del título de anticuerpos policlonales, H54 fue dializada contra una solución Tris-salina [500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10% glicerol]; mientras que, para la purificación de anticuerpos policlonales, H54 fue dializada contra una solución bicarbonato-salina [500 mM NaCl; 100 mM NaHCO₃; 10% glicerol].

4.14. Producción de anticuerpos policlonales

La proteína recombinante H54 fue utilizada como inmunógeno para la producción de anticuerpos policlonales en conejo. 50-100 µg de H54 en adyuvante de Freund (Sigma Chemicals) fueron utilizados para inmunizar dos conejos NZW cada 8 días durante tres meses. Cada 21 días se realizó la valoración del título de anticuerpos mediante inmunoensayo tipo ELISA usando protocolos estándar de laboratorio [Harlow y Lane, 1988].

Placas de 96 pozos *Maxisorp*[®] (NUNC) fueron sensibilizadas con 500 ng, por pozo, de H54 durante la noche. Cada pozo fue bloqueado con gelatina [0.5% gelatina; 0.2% Tween 20; 50 mM Tris-HCl pH 8.0] durante 2 horas. El reconocimiento primario fue realizado durante 1 h, utilizando diluciones seriadas de 3 del suero en solución vehículo [50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mg/mL de gelatina; 500 mM NaCl; 0.05% Tween 20]. El reconocimiento secundario fue realizado durante 1 h, utilizando una dilución 1:1000 del conjugado cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Zymed) en solución vehículo. El revelado del reconocimiento fue realizado mediante reacción cromogénica, usando un solución de 500 µg/mL de ABTS (Boehringer Mannheim) en solución 1X de reacción de ABTS[®] (Boehringer-Mannheim). Se permitió la reacción durante 10 minutos y se paró con 50% ácido fluorhídrico (REPROQUIFIN, S.A.). La absorbancia del color desarrollado fue registrada usando un lector de microplacas BIORAD 550 con el filtro de 405 nm.

4.15. Purificación de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales anti-*EhSRP54* fueron purificados mediante cromatografía de inmunoafinidad usando la proteína H54 como inmunoadsorbente siguiendo protocolos estándar de laboratorio [Harlow y Lane, 1988]. 2.5 mg de H54 purificada fue acoplada a Sefarosa 4B - CNBr (Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los anticuerpos policlonales fueron purificados a partir de alícuotas de 1 y 3 mL de suero hiperinmune. El suero fue pasado 3 ocasiones a través de la columna *Sepharosa-H54* permitiendo la unión antígeno-anticuerpo. La columna fue lavada con 15 vol de 100

mM Tris-HCl (pH 8.0) y 10 vol de 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 500 mM NaCl. Los anticuerpos policlonales anti-*EhSRP54* fueron separados con 100 mM ácido acético, neutralizados inmediatamente, y su concentración fue valorada mediante A_{280} (1.35 U de A_{280} es equivalente a 1 mg/mL de anticuerpo IgG). BSA acetilada y NaN_3 fueron añadidos a una concentración final de 0.2 mg/mL y 0.02%, respectivamente, para garantizar la estabilidad de los anticuerpos.

4.16. Inmunoblot

Se prepararon lisados proteicos totales de trofozoitos de *E. histolytica* mediante lisis en solución de carga [10% glicerol; 2.5% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% 2-mercaptoetanol; 0.002% azul de bromofenol] conteniendo 2.5 mM PMSF y 500 μM E64 (Boehringer-Mannheim). Las células se lisaron mediante ebullición a 100°C durante 10 minutos. Las proteínas fueron separadas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en geles de 12.5 o 15% SDS-poliacrilamida [Laemmli, 1970]. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa S&S NC[®] (Schleicher & Schuell) durante una hora, usando el sistema de transferencia semiseca HEP-1[®] (OWL), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. La membrana fue lavada con solución TBST [10mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20] y bloqueo durante la noche con una solución lechosa [5% leche descremada *Carnation*[®]; TBST]. La reactividad, y el reconocimiento específico, de los anticuerpos policlonales anti-*EhSRP54* purificados, fue valorada mediante la técnica *Western blot* [Harlow y Lane, 1988]. El reconocimiento primario fue realizado incubando la membrana con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de anti-*EhSRP54* durante 1 h. El reconocimiento secundario se llevo a cabo incubando con una dilución 1:2,500 de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) durante 1 h. La especificidad de los anticuerpos fue revelada mediante reacción cromogénica usando los reactivos 10X NBT y BCIP (Zymed). La reacción fue detenida usando una solución 5 mM EDTA.

4.17. Inmunotinción, microscopía de fluorescencia y reconstrucciones volumétricas

Los trofozoitos de *E. histolytica* fueron adheridos a portaobjetos, en presencia de poli-(L)-lisina, durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, fueron fijados durante 30 min a 37°C con una solución de paraformaldehído [2% paraformaldehído; 0.02 M (L)-lisina; PBS]. Las células fueron permeabilizadas con una solución de 0.05% Triton X-100 durante 10 min y, posteriormente, fueron bloqueadas durante 1 h en solución lechosa [5% leche descremada *Svelty*[®] (Nestlé); PBS]. Para el reconocimiento primario, las preparaciones fueron incubadas durante 1 h a 37°C con una solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ de anti-*EhSRP54*. La detección indirecta fue realizada con anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo acoplados a diferentes fluoróforos [Rhodamina, Fluoresceína o Alexa 488 (Molecular Probes)] diluidos 1:50 en PBS. Se

permitió el reconocimiento durante 1 h a 37°C (en una cámara húmeda cubierta con papel aluminio). Las preparaciones fueron montadas con una solución de 2 mg/ml de yoduro de propidio o 1 µM de *Sytox Green*[®] (Molecular Probes) en 70% glicerol-PBS. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio confocal Bio-Rad MRC 600. Los cortes de los planos confocales fueron utilizados para realizar reconstrucciones volumétricas de trofozoitos de *E. histolytica*, usando el programa *Voxel View*[®] 2.5 (Vital Images) para Silicon Graphics.

5. RESULTADOS

El gen SRP54 de *E. histolytica* fue identificado dentro de un fragmento de 7 kb, denominado clona 22-1, aislado a partir del tamizado de un banco genómico. El tamizado fue realizado utilizando como sonda radioactiva un producto de PCR de 440 pb, previamente caracterizado en nuestro laboratorio [Mercado, 1994]. Con el fin identificar un fragmento de menor tamaño, que facilitara el proceso de secuenciación, se realizó un patrón de restricción de la clona 22-1 utilizando varias endonucleasas. Mediante este análisis, se identificó un fragmento de 2.3 kb (producto de la digestión con la endonucleasa *Clal*), que conserva el gen *EhSRP54* íntegro.

Como se observa en la Figura 13, el gen *EhSRP54* está muy cercano a otras secuencias codificantes. Durante el proceso de secuenciación y mediante el análisis de búsqueda marcos abiertos de lectura, fueron identificados los genes que codifican para la subunidad α del proteasoma, y las proteínas cinasas YAK1 y PK2. El análisis de la organización génica de la clona 22-1 muestra que el gen *EhSRP54* se transcribe en dirección opuesta a los otros genes. Además, la región intergénica localizada entre los genes SRP54 y proteasoma- α es de 244 pb de largo, una característica molecular que no se observa frecuentemente en el genoma amibiano [Bruchhaus *et al.*, 1993; Bhattacharya *et al.*, 2000].

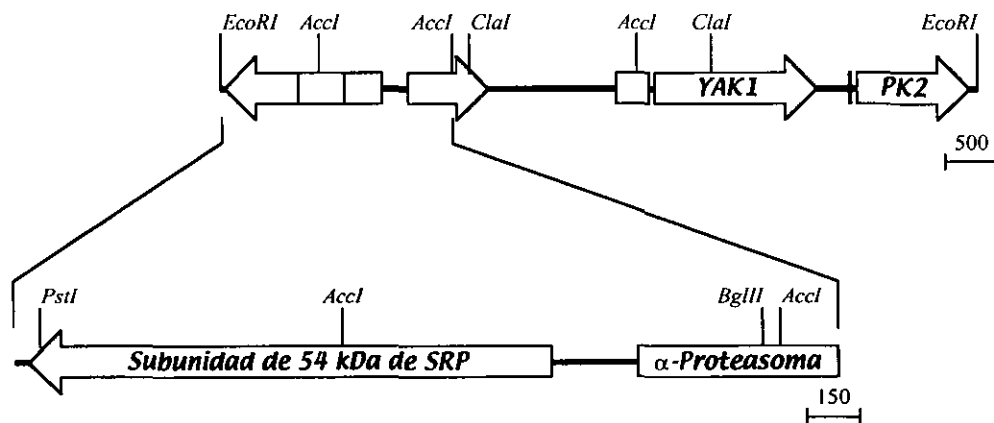


Figura 13. Esquema de la organización génica del fragmento genómico de 7 kb y de la subclona de 2.3 kb de *E. histolytica*. El diagrama muestra la orientación del gene SRP54 con respecto a otros genes. Los genes α -proteasoma, YAK1 y PK2 fueron identificados durante el proceso de secuenciación de la clona completa. La región de hibridación con la sonda de 440 pb se muestra sombreada. Algunos sitios de restricción relevantes son indicados. Las flechas indican la orientación de la transcripción de los genes. La escala indica pares de bases.

21 L R G E S S F T N V G H D N E N K T M F M
 AATCTTCC^TCAGATGAAAAGGTATTAACACCATGATCGTTTTCATTTTTAGTCATAAACATcggttagtattgaaatagctgttttcttttcaagtttctttcttttttttacttga

-151 agtttttatttttcttgattttattaatctttttttgttttttcataataaaacattttgttttttatttttaatTATAAAtagcgaatgggtgataaattttTATAAAAgaaaaatattaa

+1
 -31 taataaaactactagaaaaaaataataaaaaATAAataactgaaaattagttattggtacaacgaaATCGTACTTTCACAAC^TTCCGGTCAAGTCTTGTGACAGCATTACGTAAAAAGACT
 1 M V L S Q L G S S L V T A L R K M T

89 TCATCTACTGTGTAGATGAAGAAGTTATTAATACGTTATTAAGAGATGAAACGTCATTATTAGGGGAAGATGTCAATCCAATCTTTATTAGACAAATGGTAAATAACATAAAAAAG
 19 S S T V V D E E V I N T L L K E I E T S L L G E D V N P I F I R Q M V N N I K K

209 AAAATTAATTCAGAAGATATTCCTGATGGAATTGACAAAAGAAAGT^TTAATAAAGAT^TCTGTTTGAAGAAC^TTATCAAT^TTAG^TTGATCCAAAACTGAAGCATTAAACCCAAGAAA
 59 K I N S E D I P D G I D K R K L I K D S V F E E L I N L V D P K T E A F K P K K

329 GGAAAAACATGTGTATTAATGATGCGTTGGTTTACAAGGAGCAGGTAAAACTACTACTATTACAAAACTTGCCTTGTATTATAAAAAATCGAGGATATAAAACCAGCTGTGTGGAGCAGAT
 99 G K T C V L M M V G L Q G A G K T T T I T K L A L Y Y K N R G Y K P A V V G A D

449 ACATTTAGAGCAGGAGCATATGAACAATTACAAATGAATGCTAAACGAGCAGGAGTACCATT^TTTTGGAAATAAAGAAGAAAGT^GATCCAGTAAAAGT^TGCTAGTGAAGGAGTTCGTACC
 139 T F R A G A Y E Q L Q M N A K R A G V P F F G I K E E S D P V K V A S E G V R T

569 TTTAGAAAGGAAAAAATGATATAATTC^TTGTGTGATACATCAGGTAGACATAAACAAGATAAAGAGT^TTTAAAGAAATGCAAAGT^TCGTGATGCAATTAACCAGAT^TCAAT^TTATT
 179 F R K E K N D I I L V D T S G R H K Q D K E L P K E M Q S V R D A I K P D S I I

689 TTTGTAATGGATGGAGCTATTGGACAAGCAGCA^TTTGGACAAGCAAAGCATTAAAGATGCAGT^TGAAAGTAGGAGT^TGTTATTATAACAAAA^TIAGATGGACAT^TCAATGGAGGAGGA
 219 F V M D G A I G Q A A F G Q A K A F K D A V E V G S V I I T K L D G H S N G G G

809 GCATTAAGTCTGTAGCAGCAACAAAAAGTCCAAT^TTATATTTATTTGGAACAGGAGAAAAAGTCAATGAAGTAGAAGAAT^TTGATGCAGAAAAGT^TTGTAAGACAAT^TACTTGGAAATGGGA
 259 A L S A V A A T K S P I I F I G T G E K V N E I E E F D A E S F V R Q L L G M G

929 GATTTAAAAGGAATAGCAAAATAGCTAAAGACTTTGCAGAGAATGCTGAATATAAACTATGGTAAAAACATCTTCAAGAAGGTACATTAACAGTAAGAGATTGGAAGAACAAT^TTATCA
 299 D L K G I A K L A K D F A E N A E Y K T M V K H L Q E G T L T V R D W K E Q L S

1049 AATTTACAAAAAATGGGACAATTAGGAAATATAATGCAAAATGATTGCAATTAATCATCCAATGTTTCAAGGAGGAAATATTGAAAAAAGTTTAAAGTCTTTATGGTTATTTAGAT^TCT
 339 N L Q K M G Q L G N I M Q M I G L N H P M F Q G G N I E K K F K V F M V I L D S

1169 ATGACAGATAGAGAATTAGATGGATCAGCTAAAACAATGTTAAATGATGAAAGTAGAATTAGAAGACTTGCACGAGGAAGTGGTAGAGATATAAGAGAAGTAAATGAAC^TTTTGAACAA
 379 M T D R E L D G S A K T M L N D E S R I R R L A R G S G R D I R E V N E L F E Q

1289 ATTAATTAATCCAACAATGTATGATAGATTAC^TTAAAGCTATGAGAGCACAATTAGGAAA^TTGTAATGCACAACCTAATGAAGCAGCTATGATGCAACAAATGCAAAGAAATGCTTCC^T
 419 I K L F Q Q C I D R L P K A M R A Q L G N C N A Q P N E A A M M Q Q M Q R M L P

1409 AAAGGTGTTAATCAAGCACAATTACAACAATTAATGAAACAAATGAATGCTCGAGGATAGGAGGAACAGGAAAGAAAGGAAAGAAATAAacaaaatataaagtattactttttattgag
 459 K G V N Q A Q L Q Q L M K Q M N A A G L G G T G K K G K K *

1529 aattCAATTaacacaactttttggtt

Figura 14. Secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida del gene SRP54 de *E. histolytica*. La secuencia codificante se muestra en mayúscula, mientras que las región intergénica se indican en minúsculas, a menos que se especifique otra cosa. La numeración de cada secuencia se indica a la izquierda. La secuencia codificante para 21 aminoácidos del amino terminal de la subunidad α de proteasoma, localiza a 244 pb corriente arriba del ATG de SRP54, también se muestran. Los aminoácidos se indican en código de una letra. El nucleótido +1 se localiza a 34 pb corriente arriba del ATG de SRP54. Las señales de inicio (+1, ATAA) y terminación (+1533, CAATT) de la transcripción se indican en mayúsculas. Las secuencias putativas tipo TATA se indican en mayúsculas y negrillas. La secuencia subrayada fue determinada por secuenciación del cDNA.

Como se muestra en la Figura 15, el marco abierto de lectura del gen *EhSRP54* es de 1464 pb de largo, no contiene intrones y codifica para un polipéptido de 487 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 53.8 kDa. Como se ha observado para otros genes amibianos, *EhSRP54* presenta un bajo contenido de G + C (31%) y un uso preferencial de codones con A o T en la tercera posición de 89% [Bruchhaus *et al.*, 1993; Bhattacharya *et al.*, 2000]. En la región promotora fueron identificadas dos parecidas a cajas TATA, TATAAAA y TATAAAA (localizadas en las posiciones -51 y -77, respectivamente). A pesar de que no son totalmente idénticas a la secuencia consenso TATTTAAA [Bruchhaus *et al.*, 1993], la posición y composición de éstas sugiere que pueden ser secuencias reguladoras de la transcripción del gen *EhSRP54*.

Las regiones no traducidas del RNA mensajero de *EhSRP54* fueron determinadas mediante la técnica de RACE. El extremo 5' no traducido es 34 pb de largo e inicia con el tetranucleótido ATAA, el cual es muy similar a la secuencia consenso identificada en otros transcritos amibianos (ATCA) [Bruchhaus *et al.*, 1993]. Por otro lado, el extremo 3' no traducido es de 55 pb de largo y presenta el pentanucleótido CAATT, como la posible señal de poliadenilación, seguido de una región rica en residuos pirimidínicos (C o T); tal como se ha observado en otros transcritos amibianos, éstas son características moleculares que anteceden al sitio de poliadenilación [Bruchhaus *et al.*, 1993].

El sitio de inicio de la transcripción fue determinado por 5' RACE, técnica que ha sido utilizada satisfactoriamente para transcritos humanos [Coriton *et al.*, 2000]. En la Figura 15 se observa la presencia de un nucleótido G extra (ausente en la secuencia genómica) en el sitio inicio de la transcripción. Esta observación sugiere que el RNA mensajero de *EhSRP54* es un transcrito que sufre modificaciones co-transcripcionales en el extremo 5',

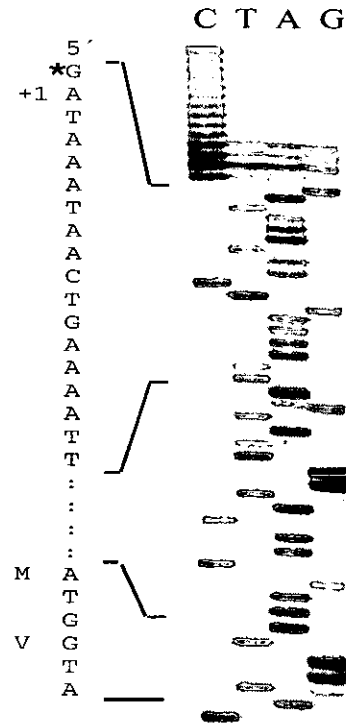


Figura 15. Determinación del inicio de la transcripción del transcrito SRP54 de *E. histolytica*. Gel de acrilamida al 7% que muestra la secuencia nucleotídica del extremo 5' del cDNA. Los nucleótidos así como los aminoácidos deducidos del marco abierto de lectura de SRP54 se indican en la izquierda del gel. La transcripción inicia con un residuo A (indicado como +1). El residuo G extra, que se señala con un asterisco, no se encuentra en la secuencia genómica (ver Figura 14).

considerándose como la primera posible evidencia del proceso de *capping* en transcritos poliadenilados en *E. histolytica*.

El número de copias del gen SRP54 presentes en el genoma de *E. histolytica* fue determinado por Southern blot. El patrón de bandas, productos de la digestión de DNA genómico con varias endonucleasas, detectadas con la sonda se 440 pb se muestra en el panel A de la Figura 16. Este patrón indica que el gen *EhSRP54* se encuentra como copia única dentro del genoma de *E. histolytica*. El tamaño del transcrito del gene SRP54, y la modificación post-transcripcional en su extremo 3', fueron determinados mediante northern blot. Como se observa en el panel B de la Figura 16, dos transcritos poliadenilados, de aproximadamente 1.6 y 1.7 kilonucleótidos, fueron detectados con la sonda de 440 pb. La presencia de dos transcritos de diferente tamaño para un mismo gen, sugiere que pueden existir diferentes grados de poliadenilación para los RNA mensajeros amibianos.

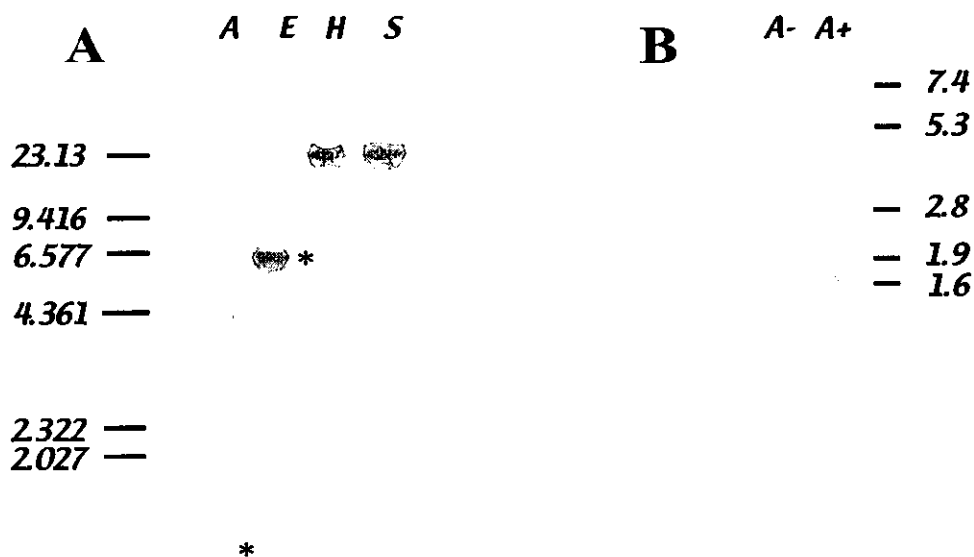


Figura 16. Organización genómica y transcripción del gene SRP54 de *E. histolytica*. (A) Análisis tipo *Southern*. DNA genómico (4 µg/carril) fue digerido con las endonucleasas de restricción [A] *Accl*, [E] *EcoRI*, [H] *HindIII* o [S] *SmaI*. Los fragmentos de digestión fueron separadas mediante electroforesis en gel de 1% agarosa y transferidos a una membrana de nylon. La detección de fragmentos de DNA se realizó mediante hibridación utilizando como sonda el fragmento de 440 pb radiomarcado (ver Figura 13). Los asteriscos indican las bandas esperadas. Los marcadores de peso molecular indicados a la izquierda (kilopares de bases). (B) Análisis tipo *Northern*. RNA poliadenilado [A⁺] y no poliadenilado [A⁻] RNA (1 µg/carril), disuelto en 2.2 M formaldehído y 50% formamida, fue separado mediante electroforesis en gel de 1.2% agarosa - 2.2 M formaldehído y transferido a una membrana de nylon. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha (kilonucleótidos). La detección del RNA realizó mediante hibridación utilizando la misma sonda que para el análisis tipo *Southern*.

El análisis tipo BLAST mostó que la secuencia polipeptídica deducida para el gen *EhSRP54* es muy similar a secuencias homólogas de plantas, mamíferos y levaduras. De acuerdo a la matriz de identidades y similitudes mostrada de la Figura 17, el polipéptido amibiano es 42-45 % idéntico a plantas, 42 % a mamíferos y 35-40 % a levaduras; mientras que es 21-35 % idéntico a sus homólogos bacterianos y de cloroplasto. Estas identidades muestran claramente el grado de conservación de la proteína SRP54 a través de la escala filogenética.

En el alineamiento múltiple presentado en la Figura 18, se observa que la proteína *EhSRP54* contiene las características polipeptídicas previamente identificadas para la familia de proteínas SRP54: un extremo amino terminal de 295 aminoácidos, o dominio G, altamente conservado y caracterizado por la presencia de las secuencias consenso para los motivos de unión a GTP, así como la presencia de la secuencia ²⁶⁹PIIFIGTGEKVNEI²⁸², considerada como la firma estructural de proteínas de unión a GTP del tipo SRP54; y un extremo carboxilo terminal de 192 aminoácidos, o dominio M, menos conservado y con un alto contenido de residuos metionina (8.3%), el cual ha sido señalado como el sitio de unión y reconocimiento del péptido señal [Bernstein, 1998].

La localización evolutiva de *E. histolytica* en el reino eucariota fue analizada, desde el punto de vista de la vía secretora, mediante inferencia filogenética usando un alineamiento de la familia de proteínas SRP54. Los árboles filogenéticos generados mediante métodos de matriz de distancias y de máxima parsimonia son topológicamente similares [Ramos *et al.*, 1997b]. El árbol filogenético presentado en la Figura 19 separa tres grandes grupos: uno que contiene a las secuencias de arqueobacterias, otro que considera a los homólogos de eubacterias y cloroplasto, y un tercero que incluye a todas las proteínas de eucariotas. Estas inferencias filogenéticas muestran que *E. histolytica* es una divergencia temprana de la ramificación eucariota. Sin embargo, este análisis no es directamente comparable con aquellos basados en EF-1 α , actina y α -tubulina [Hasegawa *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1994; Drouin *et al.*, 1995; Keeling y Doolittle, 1996], debido a que no contiene las secuencias SRP54 de otros protozoarios (p.e. *Giardia*), que pudieran dar más información con respecto al patrón de ramificación de eucariotas carentes de mitocondria.

Para analizar el posible sitio de reconocimiento del péptido señal fue estudiado mediante predicción de estructura secundaria y modelamiento tridimensional de estructuras basado en homología de secuencias. Mediante la comparación de secuencias primarias usando el programa *SearchPDB*, se identificó a la estructura cristalográfica del dominio M de la proteína SRP54 de humano. Tal estructura fue utilizada como molde para la predicción de la estructura tridimensional del dominio *EhSRP54M*. En el alineamiento mostrado en el panel A de la Figura 20, se observa que las secuencias de humano y de amiba son altamente idénticas (42%) y, además, conservan un patrón de estructuras secundarias muy similar.

	<i>similitud</i>																			
	Mjan	Mthe	HvuA	Lesc	AthA	Cspe	Hsap	Ylip	Scer	Spom	Anig	Ehis	AtCl	SspA	Ecol	Hinf	Bsub	Taqu	Mpne	
<i>identidad</i>	Mjan	----	70.8	51.7	52.6	51.4	51.9	51.9	45.0	44.0	46.0	44.2	48.3	44.3	46.6	48.8	47.2	50.4	47.3	43.7
Mthe	58.0	----	49.8	50.1	51.5	50.0	50.0	43.9	44.5	45.1	43.8	48.3	41.8	42.2	45.2	46.0	45.6	42.8	43.3	
HvuA	37.7	36.3	----	88.4	79.5	69.5	69.5	53.5	52.2	59.1	55.1	56.7	36.8	37.9	36.7	38.5	36.9	34.7	34.1	
Lesc	38.4	36.0	79.9	----	82.3	68.6	68.6	51.7	52.1	57.8	54.2	56.3	37.4	38.1	35.9	38.4	37.3	34.3	35.3	
AthA	35.4	35.5	70.2	76.2	----	65.5	65.5	51.3	52.4	56.4	52.9	54.5	36.3	36.8	36.1	38.6	37.3	34.0	33.2	
Cspe	37.9	35.2	56.0	54.5	51.7	----	100.0	57.0	55.1	62.0	55.8	56.6	38.0	39.1	37.9	39.6	38.7	38.7	36.7	
Hsap	37.9	35.2	56.0	54.5	51.7	100.0	----	57.0	55.1	62.0	55.8	56.6	38.0	39.1	37.9	39.6	38.7	38.7	36.7	
Ylip	31.9	30.3	41.3	39.8	39.5	46.3	46.3	----	66.1	65.1	65.9	51.5	33.1	35.7	34.0	35.3	35.1	33.6	32.2	
Scer	32.3	32.0	38.6	38.9	39.5	43.2	43.2	55.1	----	63.7	61.4	48.9	34.6	34.8	32.6	33.9	34.1	34.1	31.9	
Spom	32.8	31.6	42.6	42.6	42.8	48.5	48.5	50.4	50.1	----	70.3	53.6	36.5	37.9	34.8	36.8	37.7	36.8	33.0	
Anig	32.1	31.5	40.5	41.0	40.7	42.9	42.9	54.5	49.7	56.1	----	50.1	34.7	34.3	33.2	35.1	35.7	33.6	29.7	
Ehis	34.9	31.8	44.7	44.1	42.7	42.2	42.2	38.0	34.9	39.8	35.7	----	36.6	37.8	37.7	38.7	38.3	37.1	37.4	
AtCl	30.2	29.0	22.2	23.4	21.1	23.6	23.6	20.4	22.5	23.2	22.7	21.1	----	64.2	54.9	54.1	56.5	49.7	47.4	
SspA	30.6	29.4	24.2	24.0	22.8	26.0	26.0	23.5	23.1	25.6	23.4	22.6	51.1	----	56.9	57.9	60.5	53.1	51.4	
Ecol	30.4	29.6	23.2	23.9	22.5	24.3	24.3	21.1	21.1	23.2	21.0	22.3	41.1	43.9	----	86.1	67.2	60.0	52.4	
Hinf	31.8	31.0	24.6	25.7	23.1	25.8	25.8	23.7	23.3	25.6	23.6	24.3	41.1	46.6	78.1	----	66.7	56.7	49.9	
Bsub	32.1	31.1	23.6	24.7	24.7	26.0	26.0	22.8	23.8	25.1	24.2	23.5	41.9	46.3	52.0	52.9	----	63.7	53.8	
Taqu	30.0	28.3	23.4	23.3	23.3	25.4	25.4	21.7	23.1	23.2	21.9	23.1	37.3	39.7	43.9	41.6	47.5	----	48.9	
Mpne	26.0	26.6	21.6	22.9	22.3	22.3	22.3	20.4	20.9	21.3	19.7	22.4	31.5	36.0	35.3	34.2	39.3	33.0	----	

Figura 17. Comparación de secuencias SRP54. Matriz de identidades y similitudes de secuencias polipeptídicas SRP54 de varios organismos. Se obtuvo una matriz de distancias mediante un alineamiento múltiple usando el programa ClustalX y visualizada usando el programa MacBoxshade. Los valores de comparación de la secuencia amibiana con sus homólogos de otros organismos se muestran sombreados. Las secuencias están disponibles en la base de datos SRPDB. *Mpne*, *M. pneumoniae*; *Mjan*, *M. jannaschii*; *Mthe*, *M. thermoautotrophicum*; *HvuA*, *H. vulgare A*; *Lesc*, *L. esculentum*; *Cesp*, *C. species*; *Hsap*, *H. sapiens*; *Ylip*, *Y. lipolytica*; *Scer*, *S. cerevisiae*; *Spom*, *S. pombe*; *Anig*, *A. niger*; *Ehis*, *E. histolytica*; *Ecol*, *E. coli*; *Hinf*, *H. influenzae*; *Taqu*, *T. aquaticus*; *SspA*, *Synechocystis species*; *AtCl*, *A. thaliana* (cloroplasto); *Bsub*, *B. subtilis*.

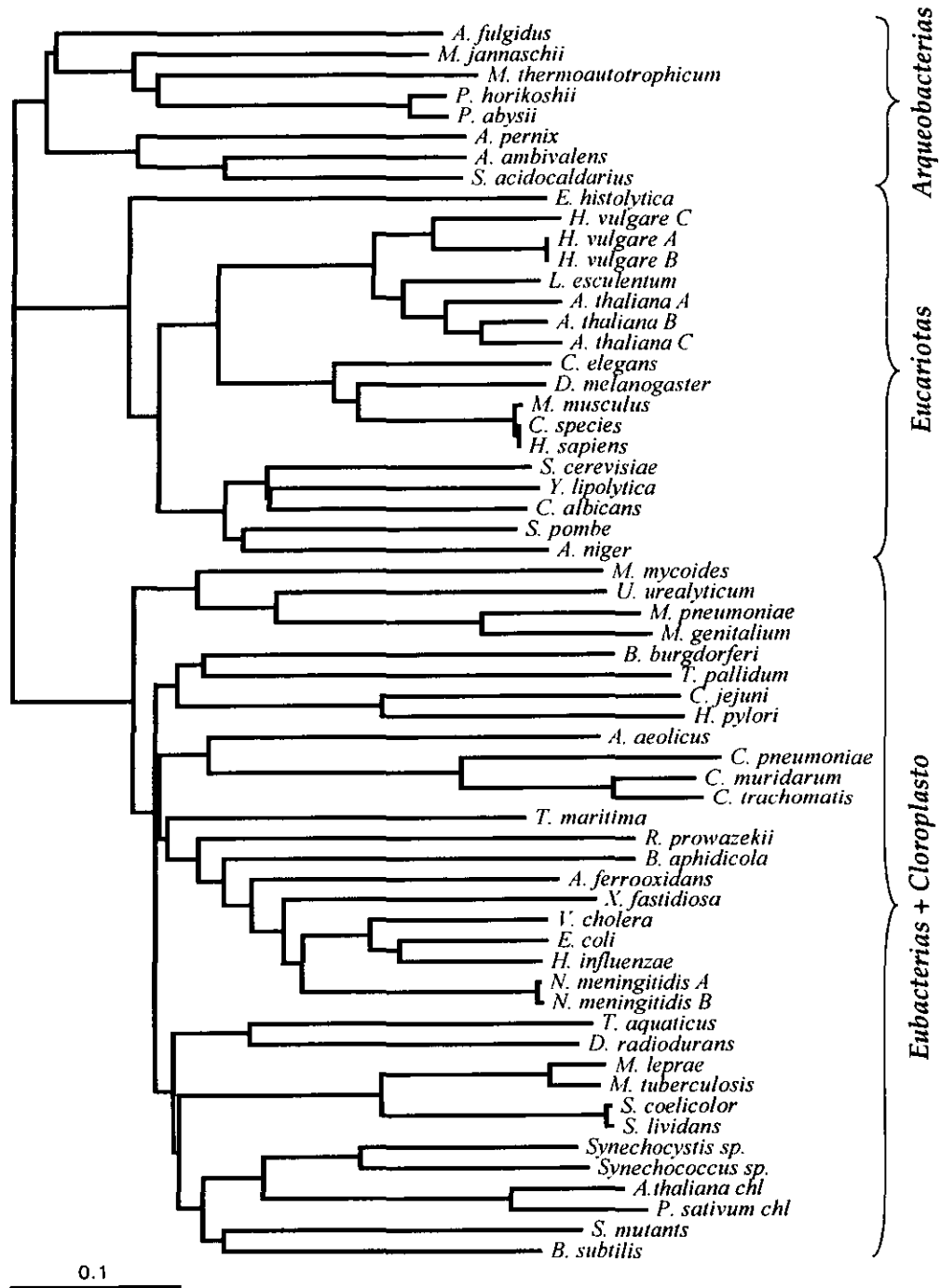


Figura 19. Arbol filogenético (filograma) de la familia de proteínas SRP54 generado por el algoritmo *neighbor-joining*. Un alineamiento múltiple de 60 homólogos de SRP54 fue realizado usando el programa ClustalX. Los segmentos con alto grado de inserción/remoción fueron excluidos del análisis filogenético. Un árbol sin raíz fue inferido a partir de una matriz de distancias calculada de acuerdo a los patrones de sustitución tipo Dayhoff PAM. El árbol fue visualizado usando el programa TreeView. La longitud horizontal de cada ramificación es proporcional al número de sustituciones. El valor de individual de cada nodo fue calculado realizando 1000 replicas. Las secuencias utilizadas fueron tomadas de la base de datos SRPDB.

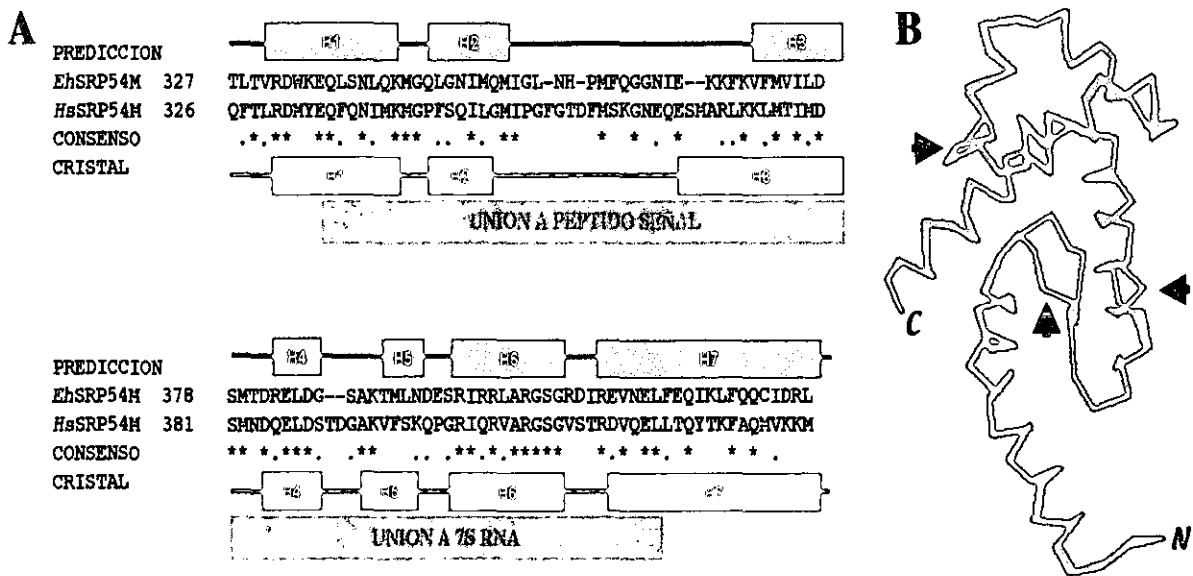


Figura 20. Predicción de estructura secundaria del dominio M de la secuencia SRP54 de *E. histolytica*. [A] Alineamiento del dominio M de las proteínas SRP54 de amiba y de humano. Los aminoácidos idénticos se indican con un asterisco, mientras que los similares con puntos. Las α -hélices de la estructura cristalográfica del dominio SRP54M de humano se muestran en rectángulos rojos (abajo) de la secuencia. La predicción de estructura secundaria del dominio SRP54M de amiba se indican en rectángulos azules (arriba de la secuencia). La numeración corresponde a localización de los residuos en la secuencia completa. Los rectángulos grises corresponden a las posibles regiones de interacción con el 7S RNA y el péptido señal. [B] Superposición estructuras de carbonos α de las secuencias SRP54M amibiana (azul) y humano (rojo). Las regiones de variación de estructuras se indican con flechas. Los extremos amino (N) y carboxilo (C) están señalados.

La predicción de la estructura tridimensional para *EhSRP54M* fue obtenida usando el programa de predicción automática *SwissModel*. En el panel B de la Figura 20 se observa la comparación de la estructura inferida para *EhSRP54M* con respecto al modelo cristalográfico de la proteína *HsSRP54M*. La superposición, usando modelos de carbonos α , muestra tres sitios de diferencia estructural, coincidentes con los brechas presentes en el alineamiento. Estructuralmente, las dos primeras diferencias se localizan en la región de unión con el péptido señal, mientras que la tercera se localiza en la región de unión al RNA 7S. A pesar de tales diferencias, la estructura tridimensional propuesta para el dominio *EhSRP54M* presenta un plegamiento similar al homólogo humano.

El panel A de la Figura 21 esquematiza el modelo de listones propuesto para la estructura tridimensional del dominio M de *EhSRP54*. Este modelo predice una estructura conformada por siete α -hélices, de las cuales, las hélices 2, 3 y 4, conforman una estructura similar a un surco. Este hecho fue confirmado realizando un modelo de representación de superficies (usando los potenciales electrostáticos de cada residuo), mostrado en el panel B

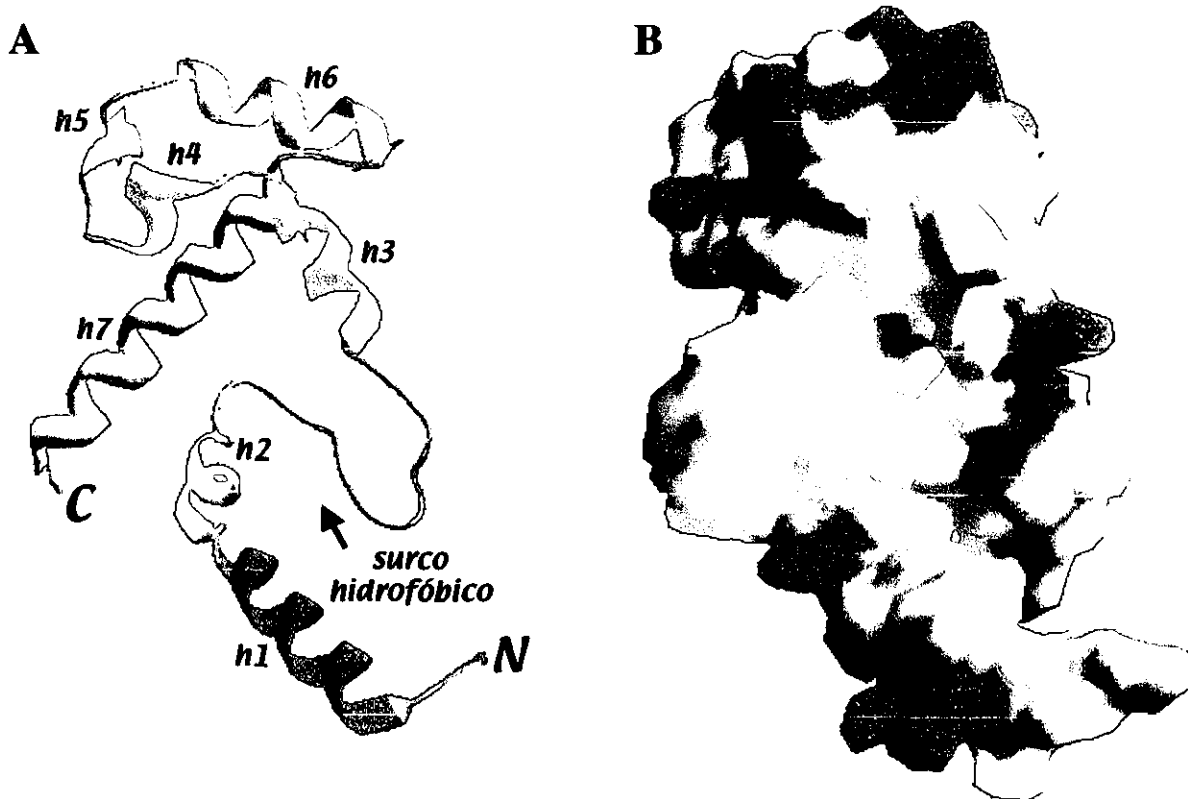


Figura 21. Predicción de la estructura tridimensional del dominio M de *EhSRP54*. (A) Representación del modelo de listones de la progresión de estructura secundaria [de azul a rojo]. Las estructuras α -hélices [h1-h7], y los extremos amino [N] y carboxilo [C] están indicados. La flecha señala la localización del surco hidrofóbico propuesto como el sitio de reconocimiento del péptido señal. (B) Representación del modelo superficie usando los potenciales electrostáticos de cada residuo. Las figuras fueron creada usando el programa SwissPDBViewer. Los aminoácidos hidrofóbicos [A, C, F, G, I, L, P, V, W, Y] se indican en amarillo a excepción de M [en verde]. Los residuos polares [N, S, T, Q], ácidos [D, E] y básicos [R, K, H] se muestran en color gris, rojo y azul, respectivamente.

de la Figura 21. Tal como se observó para la proteínas SRP54 de humano, el surco está formado principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, entre los que se incluyen algunos residuos de metionina.

Paralelamente, la proteína *EhSRP54M* fue sometida a una predicción de formación de estructuras diméricas, ésto con el fin de estudiar las posibles superficies de contacto con otras moléculas; específicamente, la interacción del surco hidrofóbico con posibles péptidos señal. La predicción fue realizada mediante el algoritmo *Oligomer* del programa *SwissModel*, usando como molde el dímero de la estructura cristalográfica de la proteína SRP54M de humano. El panel A de la Figura 22 muestra la representación tubular del modelo propuesto para la formación del homodímero de la proteína *EhSRP54M*. En ésta se observa que el surco hidrofóbico es el sitio de interacción con otras moléculas. Además, el panel B de la

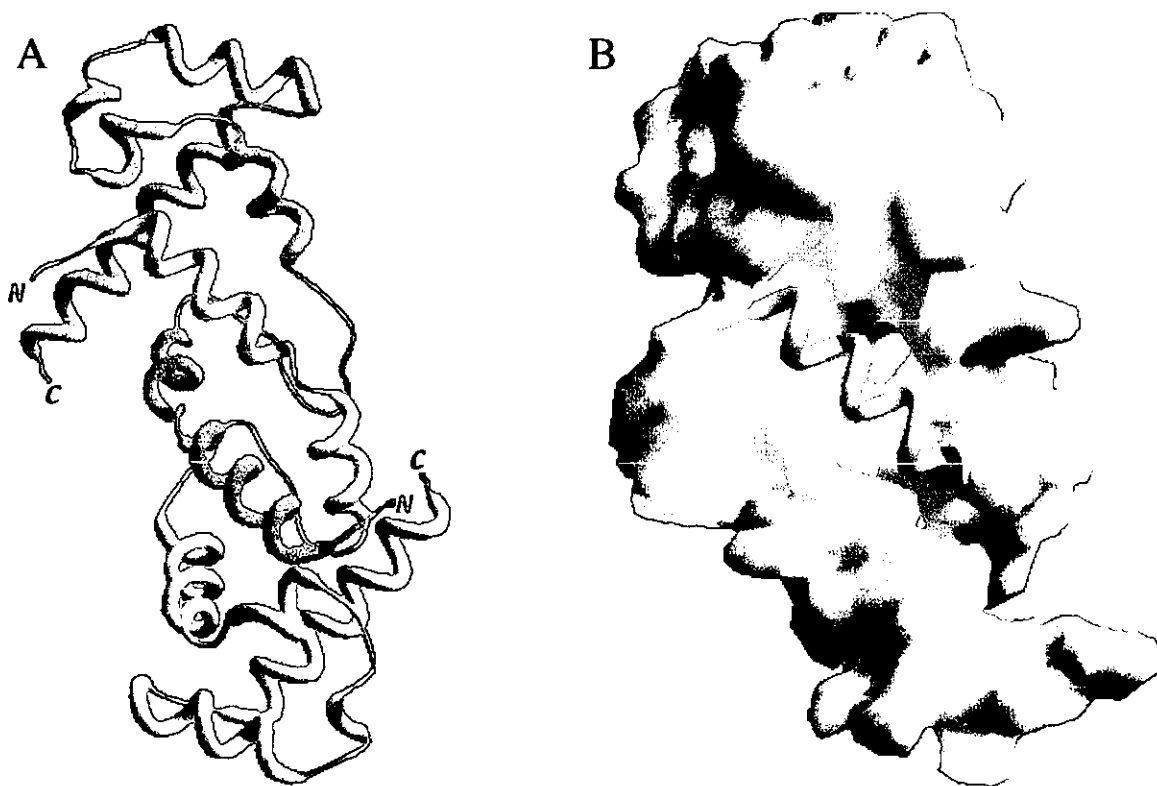
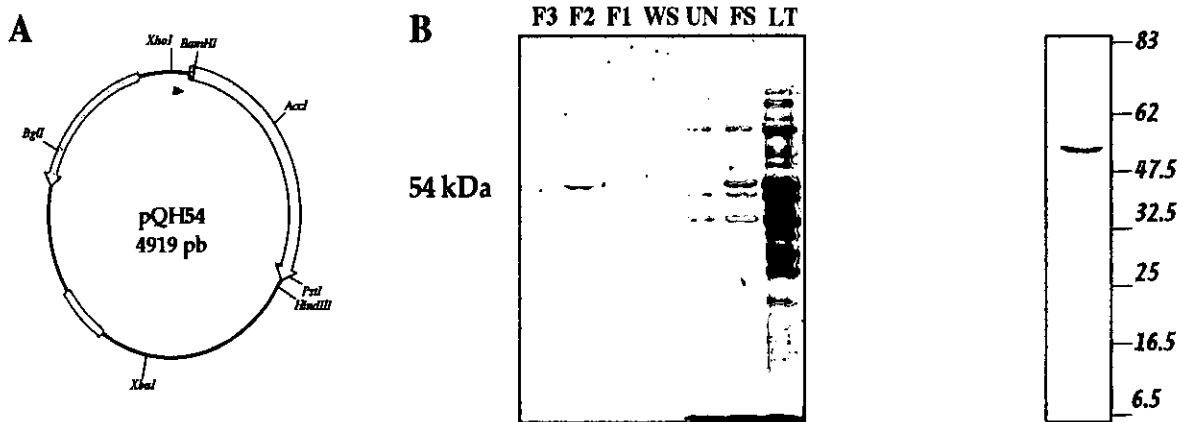


Figura 22. Predicción de la estructura dimérica del dominio M de *EhSRP54*. (A) Representación tubular de la predicción del dímero. Los monómeros están coloreados en azul [A] y en rojo [B]. Los extremos amino [A] y carboxilo [C] están señalados para cada monómero. (B) Modelo de superficie que visualiza las interacciones en sitio de reconocimiento del péptido señal. El arreglo estructural del dímero es como en el panel A. La representación tubular roja representa a la hélice α -1 del monómero B, mientras que el monómero A se presenta en estructura de superficie, resaltando sólo los aminoácidos hidrofóbicos (ver pie de Figura 20). Las figuras fueron creadas usando el programa *SwissPDBViewer*.

Figura 22, muestra una representación de superficie para el monómero A y una representación tubular para la hélice α -1 del monómero B. Esta predicción señala al surco hidrofóbico como la zona de contacto con estructuras tipo α -hélice, conformación que usualmente adoptan los péptidos señal.

Para la expresión heteróloga de la proteína *EhSRP54* se utilizó un sistema de expresión de proteínas en *E. coli*. Como se muestra en la Figura 23, la secuencia codificante para la proteína *EhSRP54* fue clonada en un vector de expresión y purificada a partir de lisados de bacterianos. La proteína *EhSRP54* recombinante fue utilizada como inmunógeno para producir y, posteriormente, purificar anticuerpos policlonales. El reconocimiento y la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-*EhSRP54* fueron evaluados mediante inmunoblot en lisados amibianos totales. Como se observa en la Figura 24, los anticuerpos



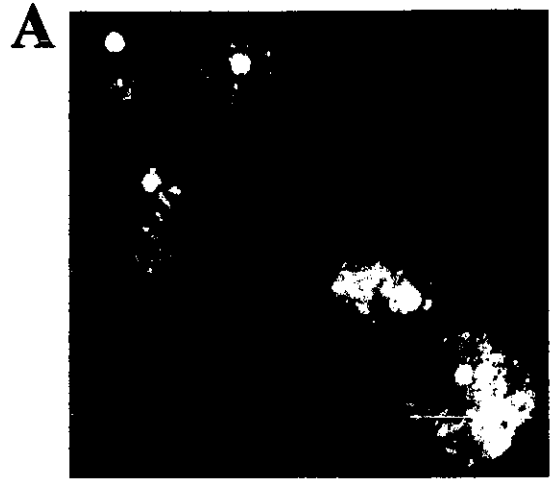
IZQUIERDA - Figura 23. Expresión y purificación de la proteína *EhSRP54* recombinante (H54). (A) plásmido pQH54. Vector que expresa la proteína *EhSRP54* etiquetada con un hexámero de histidina en el extremo amino terminal. El esquema indica algunos sitios de restricción utilizados durante la caracterización del vector. La localización del gene que codifica para β -lactamasa se indica en color azul, mientras que el origen de replicación ColE1 se muestra en rojo. La región codificante para el gene His₆-*EhSRP54* se muestra sin color. La orientación de cada gene y del promotor *lac* se indica con flechas. (B) Purificación de la proteína H54 mediante cromatografía de afinidad a níquel. Gel al 12% de SDS-poliacrilamida teñido con azul brillante de coomasie. La cromatografía se realizó usando una columna de agarosa-NTA-níquel. Las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína H54 se identifican de la siguiente manera: LT, lisado total; FS, fracción soluble; UN, fracción no pegada; WS, lavado; F1-F3, fracciones de elución con 200 mM imidazol 1 a 3. El peso molecular de la proteína purificada se indica a la derecha.

DERECHA - Figura 24. Reconocimiento de la proteína *EhSRP54* en un lisado total amibiano mediante inmunoblot. El lisado total de 50,000 trofozoitos por carril fue separado en un gel al 15% de SDS-poliacrilamida y transferido a una membrana de nitrocelulosa. 2.5 μ g/mL de anti-H54 fueron incubados con la membrana y reconocidos con anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina. La reacción de fosfatasa fue revelada con el sustrato de NBT. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha.

policlonales purificados reconocen una proteína de 54 kDa, consistente con el tamaño calculado; mientras que, el suero preinmune no presenta reconocimiento alguno (resultado no presentado). Cabe mencionar que en ocasiones se observan productos de degradación, lo que indica la susceptibilidad de la proteína SRP54 a la acción de proteasas de origen amibiano.

La localización intracelular del complejo SRP se realizó mediante la detección de la proteína SRP54 en trofozoitos de *E. histolytica* usando técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal (inmunofluorescencia). Considerando a los núcleos y las vesículas como las únicas estructuras definidas en trofozoitos de *E. histolytica*, las visualizaciones mostradas en los paneles A de las Figuras 25 y 26, señalan una distribución citoplásmica no homogénea de la proteína *EhSRP54*. Sin embargo, un conjunto de datos interesantes se pueden observar en reconstrucciones volumétricas de los cortes confocales (paneles B de las Figuras 25 y 26).

Figura 25. Inmunolocalización de la proteína SRP54 de *E. histolytica*. Trofozoitos fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos anti-*Eh*SRP54, y posteriormente, con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a rodamina. Los núcleos están contrateñidos con *Sytox Green*. Las células fueron examinadas por microscopía confocal a 40X. (A) Proyección de máxima intensidad de 70 cortes confocales de cinco trofozoitos. (B) Secuencia de la reconstrucción volumétrica de los cortes confocales de los dos trofozoitos binucleados. El número a la derecha corresponde al orden de cada cuadro en una serie de 122 obtenidos. Los controles negativos correspondientes, no dieron fluorescencia apreciable en las condiciones ensayadas (resultados no mostrados).



B

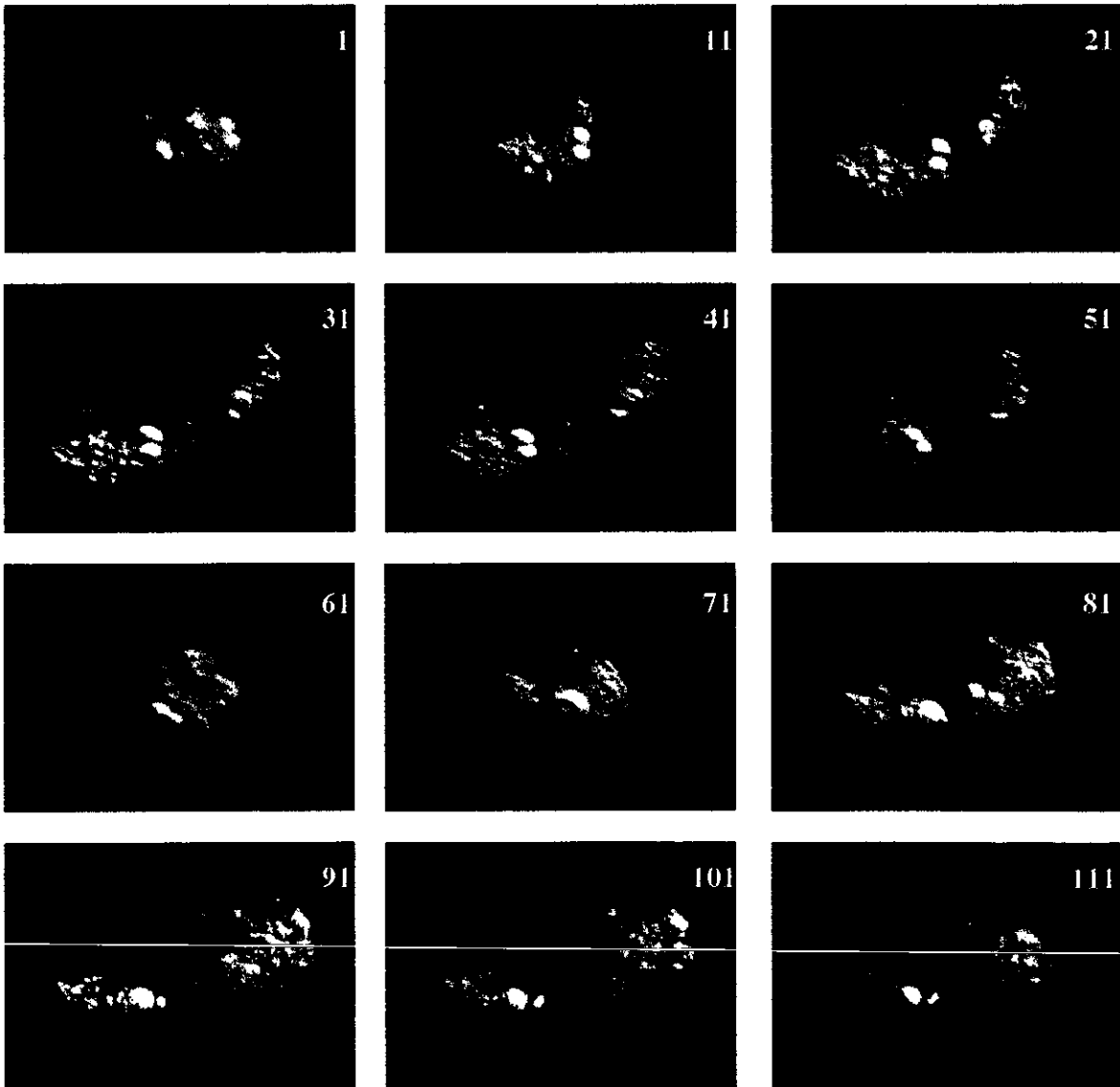
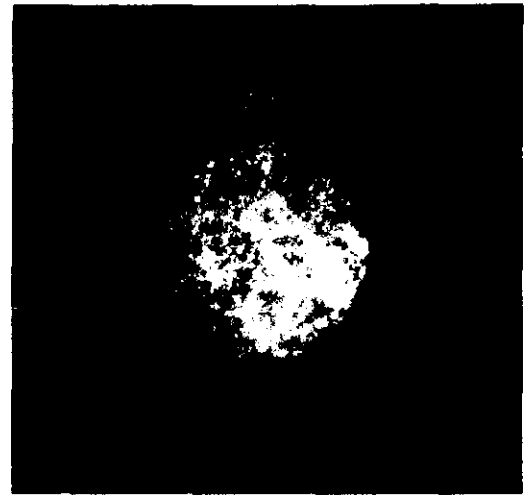
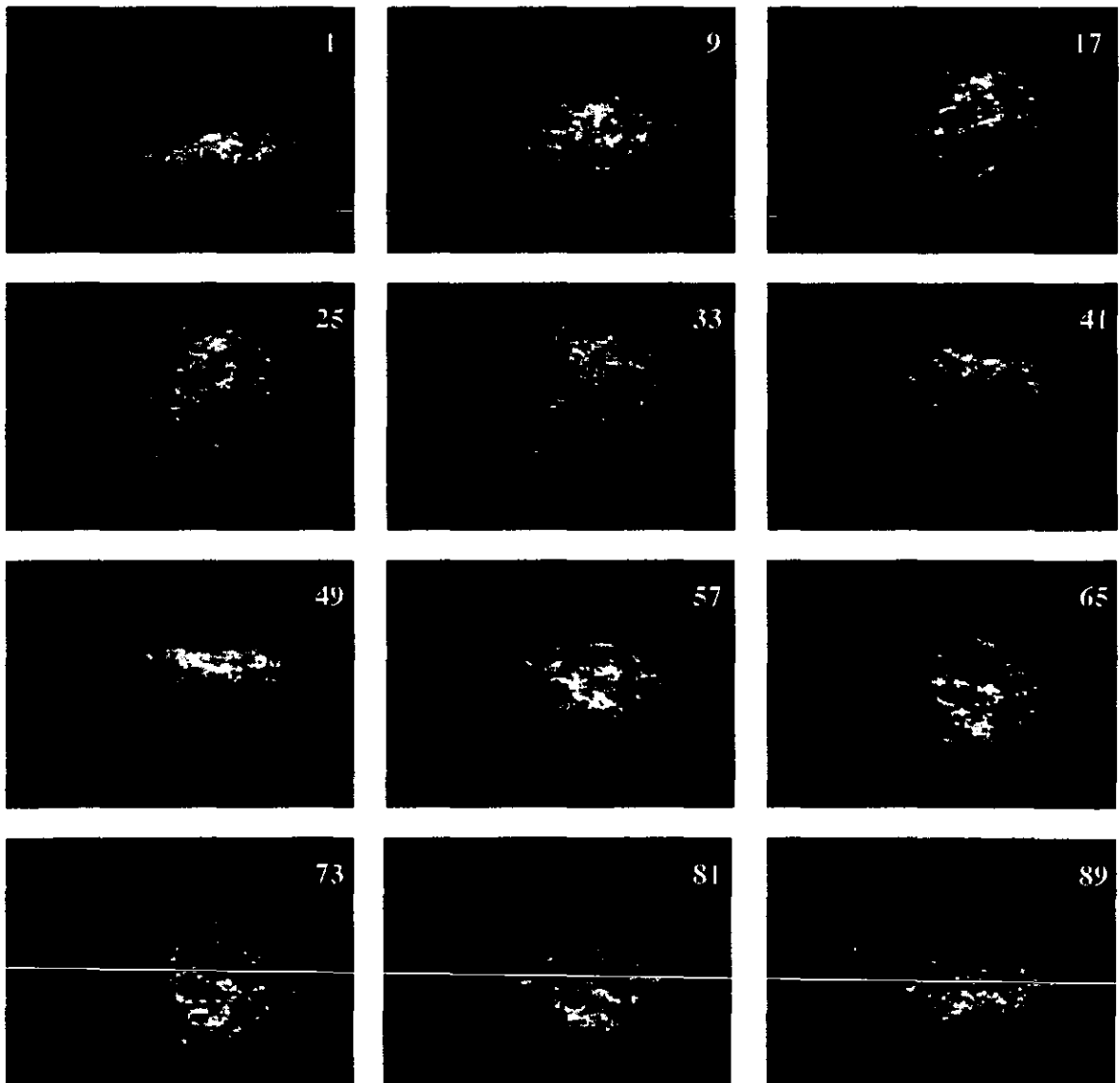


Figura 26. Inmunolocalización de la proteína SRP54 de *E. histolytica*. Trofozoitos fueron fijados, permeabilizados e incubados con anticuerpos anti-*Eh*SRP54, y posteriormente, con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a rodamina. Las células fueron examinadas por microscopía confocal a 100X. (A) Proyección de máxima intensidad de 68 cortes confocales de un trofozoito. (B) Secuencia de la reconstrucción volumétrica de los cortes confocales. El número a la derecha corresponde al orden de cada cuadro en una serie de 96 obtenidos. Los controles negativos correspondientes, no dieron fluorescencia apreciable en las condiciones ensayadas (resultados no mostrados).

A



B



Cuando los trofozoitos son visualizados a una magnificación 40X, la señal fluorescente de baja intensidad (color azul) se localiza de manera casi uniforme en todo el citosol; mientras que, la señal de alta intensidad (color rojo) se localiza, principalmente, en algunas regiones intracelulares. Además, Observaciones realizadas en reconstrucciones volumétricas de cortes confocales de una magnificación 100X Por tal motivo, suponemos que la proteína *EhSRP54* puede estar localizada tanto en el citosol, libre o asociada a ribosomas, como en contacto con posibles estructuras subcelulares en trofozoitos de *E. histolytica*.

Posteriormente, con el fin de analizar las zonas de alta fluorescencia, éstas fueron visualizadas a una magnificación 100X. La reconstrucción mostrada en el panel B de la Figura 26 La distribución de la señal se observa no homogénea, es decir, en regiones y/o estructuras celulares específicas. Estas observaciones sugieren que el complejo SRP se localiza tanto en el citosol de manera libre y, posiblemente, asociado en regiones celulares que podrían ser estructuras equivalentes al retículo endoplásmico.

6. DISCUSION

A partir del tamizado de un banco genómico de *E. histolytica*, se aisló el gen que codifica para el homólogo de la subunidad de 54 kDa de la partícula de reconocimiento de la secuencia señal (*EhSRP54*) [Ramos *et al.*, 1997b; Anexo 1]. El análisis de la organización génica mostró que este gen está muy cercano al gen que codifica para la subunidad α de proteasoma [Ramos *et al.*, 1997a; Anexo 2]; y que la región intergénica, localizada entre ambos, muestra características similares a las observadas en algunos promotores bidireccionales presentes en otros organismos: una secuencia intergénica corta y una dirección de la transcripción divergente [Shinya y Shimada, 1994; Hunt *et al.*, 1994; Gavalas y Zalkin, 1995]. Este tipo de organización sugiere una posible región promotora con algunos de los elementos reguladores compartidos o sobrelapados. Esta región puede ser estudiada mediante un análisis similar al realizado para el promotor bidireccional que regula la expresión de los genes GPAT y AIRC de gallina [Gavalas y Zalkin, 1995]. En *E. histolytica*, la presencia de posibles regiones promotoras bidireccionales hace suponer que algunas de sus actividades celulares pueden estar reguladas coordinadamente. Por otro lado, el hecho de que otros genes estructurales, como YAK1 y PK2 [Ramos *et al.*, 2000; Anexo 3], se encuentren muy cercanos a los genes SRP54 y α -proteasoma, sugiere una organización génica muy compacta, tal como se ha observado en los genomas de *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Giardia lamblia* [El-Sayed y Donelson, 1997; Smith *et al.*, 1998].

El gen *EhSRP54* codifica para un polipéptido de 53.8 kDa, consistente con la media de peso molecular para esta subunidad del complejo SRP [Gorodkin *et al.*, 2001]. Al igual que muchos otros genes, *EhSRP54* se encuentra como copia única dentro del genoma de *E. histolytica*, y se transcribe activamente durante el estadio de trofozoito [Bhattacharya *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2000]. El transcrito del gen *EhSRP54* es un RNA mensajero que sufre un procesamiento co-transcripcional, similar al que se ha observado en muchos precursores de RNA en eucariotas [Proudfoot, 2000]: adición de un nucleótido G en el extremo 5', o *capping*, y poliadenilación en el extremo 3'. El hecho de que el RNA mensajero de *EhSRP54* sea modificado co-transcripcionalmente sugiere la existencia de algún mecanismo de regulación post-transcripcional involucrado en la expresión de este gen.

La poliadenilación es una modificación frecuentemente observada en transcritos de *E. histolytica* [Bruchhaus *et al.*, 1993; Willhoeft *et al.*, 1999; Bhattacharya *et al.*, 2000]; mientras que, el *capping* es un proceso que casi no se observa y que, por ende, no ha sido estudiado. Sin embargo, en nuestro laboratorio, también se ha observado la presencia de un

residuo G en los sitios de inicio de la transcripción de otros RNA mensajeros (*EhRab8* y *EhYAK1*, comunicaciones personales), sugiriendo que el *capping* es una modificación co-transcripcional que sufren algunos transcritos poliadenilados de *E. histolytica*, tal como se ha observado en RNA mensajeros de otros eucariotas [Varani, 1997]. Para estudiar el mecanismo de *capping* en *E. histolytica*, es necesario realizar experimentos encaminados a identificar las tres actividades bioquímicas caracterizadas para este mecanismo: RNA trifosfatasa, RNA guanililtransferasa y RNA (guanin-7)metiltransferasa; actividades enzimáticas que ya han sido caracterizadas para otros para otros eucariotas, incluyendo los parásitos *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* y *Plasmodium falciparum* [Silva *et al.*, 1998; Ho y Shuman, 2001]. Por otro lado, la identificación del nucleótido trifosfatado o del enlace 5´G(ppp)5´N [Michel *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1998], completarán la caracterización del sitio de inicio de la transcripción de RNA mensajeros amibianos, incluyendo el de *EhSRP54*.

Es importante la localización filogenética de *E. histolytica* con el fin de dilucidar la evolución y divergencia de eucariotas carentes de mitocondria. En árboles filogenéticos inferidos a partir secuencias del RNA ribosomal, *E. histolytica* es una ramificación tardía en el reino eucariota (posterior a *Euglena gracilis* y *Trypanosoma brucei*, ambos con mitocondria) [Cavalier-Smith, 1993], apoyando la hipótesis de la pérdida secundaria de este organelo [Clark *et al.*, 1995]. Sin embargo, se ha sugerido que los árboles filogenéticos inferidos en base al RNA ribosomal, algunas veces difieren de los árboles construídos a partir de secuencias polipeptídicas [Hasegawa y Hashimoto, 1993; Sogin *et al.*, 1993]; específicamente, cuando el contenido G+C es diferente entre los linajes [Loomis y Smith, 1995]. Los árboles filogenéticos inferidos usando las secuencias de la familia de proteínas SRP54, colocan a *E. histolytica* como una divergencia temprana de la ramificación eucariota, tal como se ha observado para las proteínas amibianas EF-1 α , actina y α -tubulina [Hasegawa *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1994; Drouin *et al.*, 1995; Keeling y Doolittle, 1996]. Desafortunadamente, debido a que secuencias SRP54 de otros protozoarios (p.e. *Trypanosoma*, *Giardia*) no están disponibles en este momento, el presente análisis no es directamente comparable con aquellos basados en las otras proteínas. Sin embargo, con la identificación de secuencias SRP54 de varios protozoarios (gracias a los proyectos de secuenciación de genomas) se podrá contar con información adicional concerniente al proceso evolutivo de la vía de secreción de proteínas y el patrón de ramificación de organismos eucariotas.

La caracterización del mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal por la molécula SRP54 ha sido motivo de varios estudios [Lütcke *et al.*, 1992; Gowda *et al.*, 1998; Clemons *et al.*, 1999]. Para *E. histolytica*, es importante identificar el mecanismo de reconocimiento de proteínas, destinadas a ser secretadas, involucradas en el proceso de

invasión y destrucción de tejidos humanos [WHO, 1997]. Una de las aproximaciones más utilizadas para determinar las posibles interacciones entre dos proteínas es el uso métodos de predicción de estructura tridimensional, basados en homología de secuencias [Skolnick y Fetrow, 2000]. El modelo obtenido para el dominio M de la proteína *EhSRP54* predice un plegamiento similar a la estructura cristalizada del homólogo humano, incluyendo a un surco hidrofóbico como el sitio de reconocimiento y unión a estructuras tipo α -hélice, conformación que usualmente adoptan los péptidos señal [Martoglio y Dobberstein, 1998]. Sin embargo, para determinar la especificidad del mecanismo de reconocimiento, es necesario realizar estudios que permitan dilucidar que residuos, del surco hidrofóbico, participan en el reconocimiento; p.e. en células de mamífero, el sistema de transporte de proteínas hacia el RE es incapaz de reconocer a la proteína vacuolar carboxipeptidasa Y de levadura (*ScCPY*); en cambio, una mutación en su péptido señal, glicina por leucina, favorece el reconocimiento y el transporte de *ScCPY* [Bird *et al.*, 1987]; de igual manera, el residuo metionina 376 (con respecto a la secuencia de humano; 373 en la secuencia amibiana), presente sólo en secuencias de eucariotes superiores, se especula participa en la distinción de señales presentes en proteínas en eucariotes superiores, de las presentes en proteínas de levadura y de bacterias [Gorodkin *et al.*, 2001]. De tal manera que, los estudios de predicción de estructura, y en el mejor de los casos el conocimiento de la estructura cristalográfica, permitirán la realización de experimentos racionales de mutaciones, dirigidas a sitios específicos, con la finalidad de estudiar la eficiencia del mecanismo de reconocimiento de proteínas mediado por *EhSRP54*.

En mamíferos, los estudios de localización en fracciones subcelulares indican que el complejo SRP se encuentra distribuido entre fracciones membranales (38%), asociado a ribosomas (48%) y libre en el citosol (15%) [Walter y Blobel, 1983]. En otro estudio, realizado durante la embriogenesis del erizo de mar, la distribución del SRP cambia dramáticamente en los diferentes estadios del desarrollo: de completamente libre en el citosol (huevo) a un 90% unido en a ribosomas, polisomas y microsomas (después de la fertilización); posteriormente, sólo el 1% permanece unido a RE en el estadio de blástula (12 hs), y aumenta a un 16% en el estadio de gastrula (36 hs); sugiriendo que el SRP juega un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas destinadas a ser secretadas, durante la embriogénesis del erizo de mar [LeBlanc e Infante, 1989]. Por otro lado, se ha observado (mediante microscopía electrónica) que trofozoitos adheridos a componentes de la matriz extracelular, como fibronectina, presentan acumulación de polirribosomas en la zona de contacto (Dr. Ricardo Mondragón, comunicación personal), lo que sugiere que maquinaria de síntesis de proteínas puede estar localizada en sitios donde los productos amibianos ejercen su función. De tal manera que, el hecho de que la proteína SRP54, o bien el complejo SRP, esté distribuido tanto en el citosol como asociado a regiones subcelulares, sugiere que en el mecanismo de transporte de proteínas amibianas, mediado por SRP, participan tanto

estructuras solubles (polirribosomas) como estructuras subcelulares que, posiblemente, corresponden a los equivalentes funcionales del retículo endoplásmico, tal como se ha observado en células de mamífero y en erizo de mar.

Por otro lado, se observa que la concentración de *EhSRP54* es variable en todos los trofozoitos, lo que sugiere que la distribución del SRP depende de la actividad secretora y del estadio celular en el que se encuentre la amiba. Desafortunadamente, no se ha logrado el proceso de enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*; sin embargo, este proceso ha sido logrado y caracterizado en *E. invadens*, una amiba de reptil [Arroyo-Begovich y Ramírez-Rojas, 1980], la cual pudiera ser utilizada como modelo para el estudio del mecanismo de transporte de proteínas durante el proceso de enquistamiento; tal como se ha descrito en *Giardia lamblia*, donde las estructuras equivalentes al retículo endoplásmico se hacen evidentes durante el proceso de enquistamiento [McCaffery y Gillin, 1994].

Adicionalmente, se puede especular acerca la estructuración de los componentes subcelulares con los cuales el SRP pudiera hacer contacto durante el mecanismo de transporte de proteínas amibianas: (1) los componentes subcelulares pueden estar fragmentados en determinado estadio del ciclo celular, como se ha observado con el retículo endoplásmico y/o el complejo de Golgi en mamíferos [Shima *et al.*, 1998; Zaal *et al.*, 1999; Hammond y Glick, 2000] y plantas [Nebenführ *et al.*, 2000]; (2) considerando que la división nuclear no está coordinada con el proceso de división celular; probablemente, las señales que desencadenan la división nuclear también activen otras señales, como las de segregación y/o fragmentación de sus estructuras subcelulares; y (3) la movilidad, la alta actividad secretora y el ciclo celular, sean factores que colaboren cooperativamente a que las estructuras que componen la vía secretora de *E. histolytica* sean organelos en constante formación y fragmentación.

Finalmente, la caracterización de las proteínas Sec61, Stt3, PDI y SRPR, entre otros, su localización subcelular (mediante microscopía confocal y electrónica) y su caracterización funcional, en modelos como *E. invadens* y/o *S. cerevisiae*, complementarán el estudio de la vía secretora de *E. histolytica*.

7. CONCLUSIONES

Como una de las primeras evidencias moleculares de la existencia de un posible mecanismo de reconocimiento de proteínas destinadas a ser secretadas, similar al identificado en otros organismos, se clonó el gen que codifica para la subunidad de 54 kDa de la partícula de reconocimiento de la secuencia señal, o SRP54, del parásito protozoario *Entamoeba histolytica*. La identificación de los genes α -proteasoma, YAK1 y PK2, cercanos a la secuencia SRP54, sugiere una organización génica muy compacta en el genoma de *E. histolytica*. La presencia de una región reguladora con características similares a los promotores bidireccionales, ubicada entre los genes SRP54 y α -proteasoma, sugiere la posibilidad de mecanismos de regulación coordinados para proteínas amibianas. El transcrito *EhSRP54* presenta un nucleótido G en su extremo 5', primera evidencia de una posible modificación co-transcripcional similar al *capping*; sin embargo, se requieren de más datos experimentales para poder establecer la existencia de este mecanismo en *E. histolytica*. La proteína SRP54 de *E. histolytica* es una proteína eucariótica más antigua que sus homólogos presentes en plantas, mamíferos y levaduras, colocando a este protozoario en una ramificación temprana de este reino. El modelo tridimensional del dominio M de *EhSRP54* predice una estructura similar a un surco hidrofóbico como la región de unión y reconocimiento del péptido señal. Aún más, este sitio podría ser capaz de interactuar con estructuras α -hélice, conformación estructural usualmente adquirida por secuencias señal. La distribución intracelular de la proteína SRP54 sugiere que el complejo SRP se localiza tanto en el citosol como asociado en regiones celulares que, posiblemente, podrían ser estructuras equivalentes al retículo endoplásmico. Finalmente, *E. histolytica* es un organismo en constante movimiento y, por ende, con un citoplasma fluido; por lo tanto, se especula que la maquinaria que participa en las primeras etapas de la vía secretora se encuentra concentrada en regiones donde, probablemente, requiera de la síntesis de componentes proteicos necesarios para su estilo de vida parasitario.

BIBLIOGRAFIA

- Aragual A, Pandey VC, Kumar S, Sagar P (1989) Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NIH-200 and properties of the extracellular enzyme. *J Protozool* 36:90-2.
- Althoff S, Selinger D, Wise J (1994) Molecular evolution of the SRP cycle components: functional implications. *Nucleic Acids Res* 22(11):1933-47.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.
- Andreazzoli M, Gerbi S (1991) Changes in 7SL RNA conformation during the signal recognition particle cycle. *EMBO J* 10(4):767-77.
- Arroyo R, Orozco E (1987) Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 23(2):151-8.
- Arroyo-Begovich A, Ramirez-Rojas O (1980) Origin of sac-shaped walls in *Entamoeba invadens* cultures during encystment process. *Arch Invest Med* 11(1):17-23.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
- Bakatselou C, Kidgell C, Clark GC (2000) A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 110(1):177-82.
- Bakker-Grunwald T, Wöstmann C (1993) *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* 9(1):27-31.
- Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1996) The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 135(1):19-35.
- Bernstein H, Poritz M, Strub K, Hoben P, Brenner S, Walter P (1989) Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* 340:482-6.
- Bernstein HD (1998) Protein targeting: getting into the groove. *Curr Biol* 8:R715-8.
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S (2000) The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 30:401-10.
- Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS, Soldo AE (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool* 36:455-8.
- Bird P, Gething MJ, Sambrook J (1987) Translocation in yeast and mammalian cells: not all signal sequences are functionally equivalent. *J Cell Biol* 105:2905-14.
- Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100:243-55.
- Blobel G, Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across the membrane. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67:835-51.
- Bonfanti L, Mironov AA Jr, Martínez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A (1998) Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95(7):993-1003.
- Bovia F, Bui N, Strub K (1994) The heterodimeric subunit SRP9/14 of the signal recognition particle functions as permuted single polipeptide chain. *Nucleic Acids Res* 22(11):2028-35.
- Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas M, Tannich E (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* 12:925-33.
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 50(4):412-9.
- Cavalier-Smith T (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57:953-94.
- Clark CG, Roger AJ (1995) Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6518-21.
- Clemons WM Jr, Gowda K, Black SD, Zwieb C, Rammakrishnan V (1999) Crystal structure of the conserved subdomain of human protein SRP54M at 2.1 Å resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. *J Mol Biol* 292:697-705.
- Coriton O, Lepourcelet M, Hampe A, Galibert F, Mosser J (2000) Transcriptional analysis of the

- 69-kb sequence centromeric to HLA-J: a dense and complex structure of five genes. *Mamm Genome* 11:1127-31.
- Corsi AK, Schekman R (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271(48):30299-302.
- Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE (1994) Secretory proteins move through the ER membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78:461-71.
- Das P, Debnath A, Muñoz ML (1999) Molecular mechanisms of pathogenesis in amebiasis. *Indian J Gastroenterol* 18(4):161-6.
- Diamond LS, Clark CG (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40(3):340-4.
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC (1978) A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72: 431-2.
- Dobell C (1928) Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitology* 20:357-412.
- Drouin G, Monia de Sa M, Zuker M (1995) The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J Mol Evol* 41:841-9.
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286(5446):1882-8.
- El-Sayed NMA, Donelson JE (1997) A survey of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* genome using shotgun sequencing. *Mol Biochem Parasitol* 84:167-78.
- Espinoza-Castellano M, Martínez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13(2):318-31.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - phylogeny inference package. *Cladistics* 5:164-6.
- Gavalas A, Zalkin H (1995) Analysis of the chicken *GPAT/AIRC* bidirectional promoter for *de novo* purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem* 270(5):2403-10.
- Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J (1999) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* 67(6):3073-81.
- Gitler C, Mirelman D (1986) Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* 40:237-61.
- Gorodkin J, Knudsen B, Zwieb C, Samuelsson T (2001) SRPDB. *Nucleic Acids Res* 29(1):169-70.
- Gowda K, Black S, Moeller I, Sakakibara Y, Liu M-C, Zwieb C (1998) Protein SRP54 of human signal recognition particle: cloning, expression, and comparative analysis of functional sites. *Gene* 207:197-207.
- Grunstein M, Hogness DS (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(10):3961-5.
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-23.
- Gutiérrez A, Sanchez-Lopez R, Ramos MA, Alagon A (2000) Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Arch Med Res* 31(4):S162-4.
- Hammond AT, Glick BS (2000) Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol Biol Cell* 11:3013-30.
- Hann B, Poritz M, Walter P (1989) *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* contain a homologue to the 54-kD subunit of the signal recognition particle that in *S. cerevisiae* is essential for growth. *J Cell Biol* 109(6):3223-30.
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Harter C, Reinhard C (2000) The secretory pathway: from the story to the state of art. En "Subcellular Biochemistry" Vol. 34: "Fusion of Biological Membranes and Related Problems". Hilderson HJ, Fuller S (Editores) Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. Pags:1-38.
- Hasegawa M, Hashimoto T (1993) Ribosomal RNA trees misleading?. *Nature* 361:23.
- Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, Iwabe N, Miyaka T (1993) Early branching in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequences. *J Mol Evol* 36:380-8.
- Hashimoto T, Nakamura Y, Nakamura F, Shirakura T, Adachi J, Goto N, Okamoto K-I, Hasegawa M (1994) Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a

- mitochondrial-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. Mol Biol Evol 11:65-71.
- Ho CK, Shuman S (2001) A yeast-like mRNA capping apparatus in *Plasmodium falciparum*. Proc Nat Acad Sci USA 98(6):3050-5.
- Honda A, Mizumoto K, Ishihama A (1998) Identification of the 5' terminal structure of influenza virus genome RNA by a newly developed enzymatic method. Virus Res 55:199-206.
- Hooft RWW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1997) Errors in protein structures. Nature 381:272.
- Hubber M, Koller B, Gitler C, Mirelman, D, Ravel M, Rozenblatt S, Garfinkel L (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. Mol Biochem Parasitol 32:285-96.
- Hunt MD, Pettis GS, McIntosh MA (1994) Promoter and operator determinants for fur-mediated iron regulation in the bidirectional *febA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin system. J Bacteriol 176:3944-55.
- Juárez P, Sanchez-Lopez R, Ramos MA, Stock RP, Alagon A (2000) Rab8 as a molecular model of vesicular trafficking to investigate the latter steps of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 31(4):S157-59.
- Kalies K-U, Hartmann E (1998) Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER). Eur J Biochem 254:1-5.
- Keeling PJ, Doolittle F (1996) Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. Mol Biol Evol 13:1297-1305.
- Keenan RJ, Freymann DM, Walter P, Stroud RM (1998) Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. Cell 94(2):181-191.
- Keller P, Simons K (1997) Post-Golgi biosynthetic trafficking. J Cell Sci 110:3001-9.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(259):680-5.
- LeBlanc JM, Infante AA (1989) Association of 7 SL RNA and an SRP-like particle with polysomes and endoplasmic reticulum in the developing sea urchin embryo. Dev Biol. 132(1):139-52.
- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 88(17):7659-63.
- León G, Sánchez-Salas JL, Salazar MI, Moreno MA, Muñoz ML (2000) *Entamoeba histolytica* contains a TER-ATPase. Arch Med Res 31(4):S160-1.
- Loomis WF, Smith DW (1995) Consensus phylogeny of *Dictyostelium*. Experientia 51(12):1110-5.
- Luirink J, Dobberstein B (1994) Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. Mol Microbiol 11(1):9-13.
- Lütcke H, High S, Römish K, Ashford A, Dobberstein B (1992) The Methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. EMBO J 11(4):1543-51.
- Lütcke H, Prehn S, Ashford A, Remus M, Frank R, Dobberstein B (1993) Assembly of the 68- and 72-kD proteins of signal recognition particle with 7S RNA. J Cell Biol 121(5):977-85.
- Lyko F, Martoglio B, Jungnickel B, Rapoport TA, Dobberstein B (1995) Signal sequence processing in rough microsomes. J Biol Chem 270:19873-8.
- Lynch EC, Rosenberg IM, Gitler C (1985) An ion-channel protein produced by *Entamoeba histolytica*. EMBO J 7:801-4.
- Martínez-Palomo A (1986) Biology of *Entamoeba histolytica*. En "Amebiasis". Martínez-Palomo A (Editor). Elsevier, Amsterdam. Human Parasitic Series 2. Pags:11-43.
- Martínez-Palomo A (1988) Biology of amebiasis: progress and perspectives. En "The Biology of Parasitism". Englund PT, Sher A (Editores). Alan R Liss, New York. Pags:61-76.
- Martínez-Palomo A (1993) Parasitic amebas of the intestinal tract. En "Parasitic Protozoa". Krierer JP, Baker JR (Editores). Academic Press, New York. 2nd Edition. Pags:66-141.
- Martínez-Palomo A, Espinoza-Castellano M (1998) Intestinal amoebae. En "Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections". Cox FEG, Krierer JP, Wakelin D (Editores). Arnold, Londres. 9th Edition, Vol. 5: Parasitology. Pags:157-177.
- Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. Trends Cell Biol. 8:410-5.
- Mazzucco A, Benchimol M, De Souza W (1997) Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. Micron 28(3):241-7.
- McCaffery JM, Gillin FD (1994) *Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth and encysting. Exp Parasitol 79(4):220-35.
- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J (1993) The proteases and pathogenicity of

- parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 47:821-53.
- Mellman I, Warren G (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100:99-112.
- Mercado G (1994) Obtención y caracterización de un fragmento del gene SRP54 de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UNAM.
- Michel B, Lizardi PM, Alagón A, Zurita M (1995) Identification and analysis of the start site of ribosomal RNA transcription of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 73:19-30.
- Mironov AA, Weidman P, Luini A (1997) Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules. *J Cell Biol* 138(3):481-4.
- Muñoz ML, Moreno MA, Perez-García JN, Tovar GR, Hernandez VI (1991) Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. *Mol. Microbiol.* 5(7):1707-14.
- Muñoz ML, Rojkind M, Calderon J, Tanimoto M, Arias-Negrete S, Martínez-Palomo A (1984) *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J Protozool* 31(3):468-70.
- Nebenführ A, Frohlich JA, Staehelin LA (2000) Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol* 24:135-51.
- Ng DTW, Walter P (1994) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Curr Op Cell Biol* 6:510-6.
- Nunnari J, Walter P (1992) Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Curr Op Cell Biol* 4:573-80.
- Orci L, Halban P, Amherdt M, Ravazzola M, Vassalli JD, Perrelet A (1984) A clathrin-coated, Golgi-related compartment of the insulin secreting cell accumulates proinsulin in the presence of monensin. *Cell* 39(1):39-47.
- Orci L, Perrelet A, Ravazzola M, Amherdt M, Rothman JE, Schekman R (1994) Coatamer-rich endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11924-8.
- Orci L, Starnes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90(2):335-49.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applic Biosci* 12:357-8.
- Palade G (1975) Intracellular aspects on the process of protein synthesis. *Science* 189:347-58.
- Pelham HR (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct Funct* 21(5):413-9
- Perez-Montfort R, Ostoa-Saloma P, Velazquez-Medina L, Montfort I, Becker I. (1987) Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 26(1-2):87-97.
- Petri Jr WA, Chapman MD, Snodgrass T, Mann BJ, Broman J, Ravdin JI (1989) Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 264(5):3007-12.
- Petri Jr WA, Haque R, Lysterly D, Vines RR (2000) Estimating the impact of amebiasis in health. *Parasitol. Today* 16(8):320-1.
- Petter R, Moshitch S, Rozenblatt S, Nuchamowitz Y, Mirelman D (1992) Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 150(1):181-6.
- Petter R, Rozenblatt S, Nuchamowitz Y, Mirelman D (1992) Linkage between actin and ribosomal protein L21 genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 56:329-33.
- Proudfoot N (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 25:290-3.
- Ramos MA, Alagon A (2000) Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31(4):S173-5.
- Ramos MA, Stock RP, Sanchez-Lopez R, Olvera F, Lizardi PM, Alagón A (1997a) The *Entamoeba histolytica* proteasome alpha-subunit gene. *Molec Biochem Parasitol* 84:131-5.
- Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sanchez-Lopez R, Stock RP, Lizardi PM, Alagón A (1997b) *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol Biochem Parasitol* 88(1-2):225-35.
- Ramos MA, Sánchez-López R, Alagón A (2000) Genomic organization of a 7 Kb gene cluster from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31(4):S263-5.
- Rapiejko P, Gilmore R (1992) protein translocation across the ER requires a functional GTP binding site in the α subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 117(3):493-503.
- Rapoport T (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258:931-6.
- Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA (1985) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of

- Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 152(3):542-9.
- Rodríguez MA, Garcia-Perez RM, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Mendoza L, Ortiz-Navarrete V, Orozco E (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. Mol Biochem Parasitol 108 (2):199-206.
- Rosales-Encina JL, Meza I, López de León A, Talamás-Rohana P, Rojkind M. (1987) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 156(5):790-7.
- Rost B, Sander C (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict of protein secondary structure. Proteins 19:55-72.
- Rothman JE, Wieland FT (1996) Protein sorting by transport vesicles. Science. 272(5259):227-34.
- Saavedra-Lira E, Perez-Monfort R (1994) Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. Gene 142:249-51.
- Saito-Nakano Y, Yasuda T, Shigeta Y, Nakazawa M, Takeuchi T, Nozaki T (2000) Identification and characterization of a rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 31(4):S155-6.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4(4):406-25.
- Sakaguchi M (1997) Eukaryotic protein secretion. Curr Op Biotechnol 8:595-601.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sanchez-Lopez R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM, Alagón A (1998) Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. Mol Biochem Parasitol 92(2):355-9.
- Sanchez-Lopez R, Siminovich B, Alagón A (2000) *Entamoeba histolytica* codes for a protein homologue of the sec61 alpha subunit, a component of the endoplasmic reticulum translocon. Arch Med Res 31(4):S168-70.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74(12):5463-7.
- Sayle RA, Milner-White EJ (1995) RasMol: Biomolecular graphics for all. Trends in Biochemical Sciences 20:374-6.
- Schartz G, Dobberstein B (1996) Common principles of the protein translocation across membranes. Science 217:1519-26.
- Shima DT, Cabrera-Poch N, Pepperkok R, Warren G (1998) An ordered inheritance strategy for the Golgi apparatus: visualization of mitotic disassembly reveals a role for the mitotic spindle. J Cell Biol 141(4):955-66.
- Shinya E, Shimada T (1994) Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein I genes. Nucleic Acids Res 22:2143-9.
- Siegel V, Walter P (1988) Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. Cell 52:39-49.
- Silva E, Ullu E, Kobayashi R, Tschudi C (1998) *Trypanosome* capping enzymes display a novel two-domain structure. Mol Cell Biol 18(8):4612-9.
- Skolnick J, Fetrow JS (2000) From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in the genomic era. Trends in Biotechnol 18:34-9.
- Smith MW, Aley SB, Sogin M, Gillin FD, Evans GA (1998) Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. Mol Biochem Parasitol 95:267-80.
- Sogaard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE, Sollner T (1994) A Rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. Cell 78(6):937-48.
- Sogin ML, Hinkle G, Leipe DD (1993) Universal tree of life. Nature 362:795.
- Stanley SL Jr, Huizenga H, Li E (1992) Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 50(1):127-38.
- Stroud RM, Walter P (1999) Signal sequence recognition and protein targeting. Curr Op Struct Biol 9:754-9.
- Tannich E, Horstmann RD (1992) Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Mol Evol 34(3):272-3
- Tatusova TA, Madden TL (1999) Blast 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett 174:247-50
- Temesvari LA, Harris EN, Stanley SL Jr, Cardelli JA (1999) Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. Mol Biochem Parasitol 103(2):225-41.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for

- multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24):4876-82.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Tooze J, Tooze SA (1986) Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J Cell Biol* 103(3):839-50.
- Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I (1991) Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 45(1):121-30.
- Tovar J, Fischer A, Clark CG (2000) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* 32(5):1013-21.
- Valdes J, De la Cruz-Hernández F, Ocadiz R, Orozco E (1990) Molecular karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84(4):537-41.
- Varani G (1997) A cap for all occasions. *Structure* 5:855-8.
- Vargas-Rodriguez L, Villagomez-Castro JC, Flores-Carreón A, Lopez-Romero E (1998) Identification and characterisation of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 28(9):1333-40.
- Villagomez-Castro JC, Calvo-Mendez C, Vargas-Rodriguez L, Flores-Carreón A, Lopez-Romero E (1998) *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp Parasitol* 88(2):111-20.
- Walsh JA (1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8:228-38.
- Walter P, Blobel G (1983) Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. *J Cell Biol* 97(6):1693-9.
- Walter P, Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87-119.
- Walter P, Gilmore R, Blobel G (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38:5-8.
- Werries E, Nebinger P, Franz A (1983) Degradation of biogenic oligosaccharides by beta-N-acetyl-glucosaminidase secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 7(2):127-40.
- WHO, World Health Organization (1997) Report of the expert consultation on amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiological Record* 72(14):97-100.
- Willhoeft U, Buss H, Tannich E (1999) Analysis of cDNA expressed sequence tags from *Entamoeba histolytica*: identification of two highly abundant polyadenylated transcripts with no overt open reading frames. *Protist* 150(1):61-70.
- Zaal KJM, Smith CL, Polishchuk RS, Altan N, Cole NB, Ellenberg J, Hirschberg K, Presley JF, Roberts TH, Siggia E, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (1999) Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. *Cell* 99:589-601.
- Zwieb C (1994) Site-directed mutagenesis of signal recognition particle RNA. *Eur J Biochem* 222:885-90.



Entamoeba histolytica contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle¹

Marco A. Ramos, Gabriel C. Mercado, Luis M. Salgado², Rosana Sanchez-Lopez, Roberto P. Stock, Paul M. Lizardi³, Alejandro Alagón *

Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, Instituto de Biotecnología (UNAM), Ave. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México

Received 20 April 1997; accepted 17 June 1997

Abstract

We have determined the nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle (SRP54) from the amitochondrial protist *Entamoeba histolytica*. The SRP54 gene was isolated from a genomic library using a polymerase chain reaction (PCR) probe. Nucleotide sequence analysis of a 2.3 kb fragment, derived from a 7 kb genomic clone, revealed an open reading frame encoding a protein of 487 amino acids (MW 53.8 kDa). The identities of the predicted amino acid sequence with its homologues from other species were between 24 and 47%. Functional domains previously defined for the SRP54-type proteins were present in the entamoebal sequence, such as the amino-terminal GTP binding domain (G domain) and the carboxy-terminal methionine rich domain (M domain). SRP54 mRNA contains an extra G residue at the 5' end, suggesting that capping of poly-A(+) transcripts is present in *E. histolytica*. Evolutionary analysis of the SRP54 based on phylogenetic inference placed the *E. histolytica* sequence as an early divergence of the eukaryotic tree. Although the function of the entamoebal homologue remains to be elucidated, the identification of the SRP54 gene constitutes the first evidence for SRP related proteins in protozoans. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Signal recognition particle; Secretory pathway; Molecular cloning

Abbreviations: SRP, signal recognition particle; SRP54, 54 kDa subunit of the signal recognition particle; PCR, polymerase chain reaction; ORF, open reading frame; ER, endoplasmic reticulum.

* Corresponding author. Tel.: + 52 73 291602; fax: + 52 73 172388; e-mail: alagon@ibt.unam.mx

¹ Note: Nucleotide sequence data reported in this paper is available in the EMBL data base under the accession number Y12515.

² Present address: Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV (IPN), Ave. Instituto Politécnico Nacional 2508, Cd. de México, D.F. 07360, México.

³ Present address: Department of Genetics, Yale University School of Medicine, 333 Cedar St., New Haven, CT 06510, USA.

1. Introduction

Understanding in detail the mechanisms that regulate protein traffic is one of the major goals of molecular cell biology. In both prokaryotic and eukaryotic cells, many proteins are targeted and translocated across biological membranes: the cytoplasmic membrane in *E. coli* and the endoplasmic reticulum (ER) membrane in yeast and mammalian cells. In prokaryotes, secretion of proteins into the periplasmic space is achieved by direct sorting of nascent polypeptides from the cytoplasm to the inner membrane. In contrast, eukaryotic cells have evolved a complex secretory pathway, comprising a series of membranous compartments (ER, Golgi apparatus, vacuoles and vesicles; termed the endomembrane system) through which a large number of proteins pass en route to the extracellular environment [1,2].

In a typical eukaryotic cell, the translocation of nascent proteins across the ER membrane is the first step in the processes that deliver proteins to the endomembrane system. A well-studied mechanism exists that mediates the selective attachment to the ER of those ribosomes that synthesize proteins that are destined for secretion. This mechanism is known as signal recognition particle-dependent protein targeting. Briefly, a protein is initially targeted to ER by the interaction of its signal sequence, as it emerges from the ribosome, with a cytoplasmic ribonucleoprotein complex known as the signal recognition particle (SRP). Binding of the nascent chain to the SRP arrests elongation until contact is made with the SRP receptor in the ER membrane. When the complex of SRP-nascent chain-ribosome is attached to the SRP receptor, SRP is released, elongation resumes, and the translocation of the nascent peptide across the ER membrane takes place [3].

The mammalian SRP consists of six distinct proteins (9, 14, 19, 54, 68, and 72 kDa, respectively) and an RNA backbone (7S RNA) [4]. The 54 kDa protein plays an important role in the protein targeting pathway. SRP54 recognizes and binds to the signal sequence of nascent proteins. Genetically and functionally SRP54 consists of two separable domains: a 33 kDa amino terminal domain with GTP binding activity (G-domain) and a 22 kDa

methionine-rich carboxy terminal domain with signal sequence binding sites (M-domain) [5]. The presence of proteins related to components of SRP in all taxonomic kingdoms demonstrates that SRP is ubiquitous; e.g. sequences encoding SRP54 protein provide compelling evidence that this component is highly conserved over vast evolutionary distances, as evidenced by the presence of invariant amino acids [2,6,7]. Therefore, the identification of SRP protein homologues from diverse organisms suggests that the SRP-mediated pathway for protein export is present in all living cells.

E. histolytica is a structurally simple eukaryote lacking mitochondria, peroxisomes and a well-developed ER and Golgi apparatus. Based on these features, *E. histolytica* has been considered as a primitive eukaryotic cell [8]. Despite an undeveloped endomembrane system it has been reported that several amoebic protein products are secreted to the extracellular environment [9–11]. Furthermore, the sequencing of genes for secreted proteins such as cysteine proteinases and amoebapores, and of membrane proteins such as the galactose-inhibitable lectin has identified the presence of signal peptides at the amino-termini of these sequences [12–15]. Hence, it is of interest to identify key components of the protein targeting mechanism and to determine the functional equivalents of the structures that are involved in the intracellular sorting and secretion of amoebic proteins. In this paper, we report the identification of the SRP54 gene and the analysis of its deduced amino acid sequence from a genomic clone of *E. histolytica*. Using this amino acid sequence and the available data from the SRP54 protein family we analyze the evolutionary relationships of *E. histolytica* from the point of view of the secretory pathway.

2. Materials and methods

2.1. Cells and parasites

The *E. histolytica* HK9 strain was used throughout this work, unless specified otherwise. Trophozoites were cultured axenically at 37°C in TYI-S-33 medium [16]. *E. coli* XL1-blue (Stratagene) and DH5 α (Gibco BRL) strains were used for routine molecular biology techniques.

2.2. Polymerase chain reaction

Based on highly conserved regions, two degenerate oligonucleotides were designed. These were named SRP54A (sense, 5'-CAAGGIISHGGIAA-IACHAC-3') and SRP54B (antisense, 5'-CCIC-CHTIGCITSICCRTC-3'). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed on *E. histolytica* genomic DNA. Conditions were: 94°C for 1.5 min, 37°C for 2 min, 72°C for 45 s (1 cycle); 94°C for 30 s, 37°C for 30 s, 72°C for 45 s (20 cycles); 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 45 s (Ten cycles); 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 2.0 min (one cycle). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. A fragment with the expected size of 440 bp was obtained and subsequently blunt-end cloned into pGEM-4Z vector (Promega) for further sequencing.

2.3. Cloning and screening strategy

For the isolation of the complete genomic sequence, an *E. histolytica* HM1:IMSS recombinant genomic library constructed in the λ ZAP vector (Stratagene) [17] was screened using the 440 bp PCR product as a radiolabeled probe. The screen of the library was performed by plaque hybridization. The insert from a strongly hybridizing clone was amplified by long PCR using eLONGase enzyme mix (Gibco BRL) and primers flanking the cloning site. A 7 kb long PCR product was analyzed by restriction endonucleases for subcloning purposes. A 2.3 kb restriction fragment, containing the SRP54 gene, was cloned into pBluescript SK-vector (Stratagene) for further sequencing.

2.4. DNA sequencing and homology analysis

The 440 bp PCR product was completely sequenced using primers flanking the cloning site. A 2.3 kb subclone, derived from a 7 kb genomic clone, was entirely sequenced using both primers flanking the cloning site and primer walking strategy. Sequencing was performed with chain terminators using the *fmol* PCR Sequencing System (Promega). Sequence data were analyzed using the

GCG package (Wisconsin). Homology searching on nucleotide and protein data bases was carried out with the BLAST program at the NCBI server [18]. Pairwise sequence alignment and protein identities were done using the PROTEIN ALIGN program of the Gene Works package (Intelligence) using the clustal algorithm and the default gap and insertion penalty settings. Secondary structure predictions were done by using the PHDsec program at the EMBL server (Heidelberg) [19].

2.5. Southern and Northern blotting

Genomic DNA was obtained by cell lysis with lithium chloride and separation of nucleic acids on a cesium chloride gradient. Total RNA was prepared using TRIzol (Gibco BRL) reagent following instructions provided by the supplier. The polyadenylated fraction was selected by oligo-d(T)-cellulose chromatography. Southern and Northern blot were carried out according to standard protocols [20]. As a hybridization probe we employed the radiolabeled 440 bp PCR product. Hybridizing bands were detected by autoradiography or by the Phosphorimager system (Molecular Dynamics).

2.6. Analysis of the 5' and 3' untranslated regions

PCR amplifications of the 5' and 3' ends of the entamoebal SRP54 transcript were performed using the rapid amplification cDNA ends (RACE) technique [21,22]. Reverse transcription (RT) was carried out with SuperScript II RT (Gibco BRL). Both, 5' and 3' ends were PCR amplified using gene-specific primers. The PCR products generated were blunt-end cloned into pBluescript SK-vector (Stratagene) for sequencing purposes.

2.7. Phylogenetic inference

SRP54 sequences from nine eukaryotes, nine eubacteria, two archaeobacteria, and from one chloroplast homologue were used with the entamoebal deduced amino acid sequence for phylogenetic analysis. A preliminary multiple sequence alignment performed with the Clustal W program

[23] was further edited manually to remove significant deletions and insertions in order to ensure that the aligned sequences were conserved regions (thus avoiding score biasing). Phylogenetic trees based on this alignment were then inferred by neighbor-joining and Fitch–Margoliash analyses on distance measurements calculated according to the Dayhoff PAM substitution matrix using the PROTDIST, NEIGHBOR and FITCH programs from PHYLIP package version 3.5 [24]. Maximum-parsimony analyses using the PROTPARS program from the same package, were performed on the same data to compare with the results obtained by the protein distance methods. Significance of individual nodes was assessed by conducting 100 bootstrap resampling replicates. Bootstrapping analyses were achieved using the SEQBOOT and CONSENSE programs from the PHYLIP package [25]. The trees were drawn using the public domain TREEVIEW program [26].

3. Results and discussion

Mammalian, yeast and bacterial SRP54 homologues contain highly conserved regions [27,28]. Degenerate oligonucleotide primers located on two regions of high sequence homology were successfully used to amplify a 440 bp fragment from genomic DNA of *E. histolytica*. Using this fragment as a radiolabeled probe we isolated a clone of about 7 kb from a genomic library. The *E. histolytica* gDNA clone contains several open reading frames (e.g. proteasome gene and unpublished data). Amplification of long PCR fragment, subsequent restriction analyses and subcloning steps, allowed us to isolate a 2.3 kb fragment containing the proteasome α -subunit [29] and the SRP54 genes (Fig. 1A).

Entamoebal gene organization of proteasome and SRP54 sequences shows unusual features [30]. As shown in Fig. 1, the intergenic region between their start codons is 244 bp long and both genes are divergently transcribed, since the ORFs are oriented in opposite directions. The divergent organization implies that some regulatory transcriptional elements may be shared and/or overlapping. This organizational scheme has been

described in several organisms [31–33]. The presence of a possible bidirectional control region in the *E. histolytica* genome is interesting because it suggests that two evolutionary conserved functions (ubiquitinated-ATP-dependent protein degradation and SRP-mediated protein secretion) are related and possibly coordinately regulated.

The SRP54 ORF is 1461 bp long and codes a protein with a theoretical molecular weight of 53.8 kDa (Fig. 1B). The nucleotide sequence analysis revealed two putative TATA-box-like sequences, TATAAAA and TATAAA, found at positions –51 to –45 and –77 to –72, respectively. Although the sequences are not identical to the consensus, TATTTAAA [30], the position and composition suggest that TATAAAA or TATAAA could be the SRP54 gene promoter sequences.

The genomic organization of the SRP54 gene was studied by Southern blotting (Fig. 2A). The set of expected bands from the restriction map of the genomic clone shown in Fig. 1A, were obtained (indicated by asterisks). This result indicates that there is a single copy of the SRP54 gene in the *E. histolytica* genome. The *E. histolytica* SRP54 gene is transcribed as polyadenylated RNA. In Northern blot analysis two transcripts were observed (Fig. 2B), with sizes of approximately 1.6 and 1.7 kilonucleotides, respectively. We think that the size differences of transcripts could be explained by different poly-A lengths, since the 5' end mapping reveals a single transcriptional start site (see below).

The untranslated regions of the SRP54 transcript were mapped using the RACE technique and cDNA sequencing. To analyze the 5' end, we used an anti-sense primer that anneals to a region located at nucleotide position +98 to +124. As shown in Fig. 2C, the transcription starts at an A residue (at 34 bp upstream the ATG codon, nucleotide position +1) and it is followed by the trinucleotide TAA which is highly similar to the consensus sequences found in other entamoebal genes [30]. The extra G residue (not present in the genomic sequence) found at the transcriptional start site suggest that the SRP54 mRNA is a G-capped transcript. This is the first evidence for capping of poly-A(+) transcripts in *E. histolytica*.

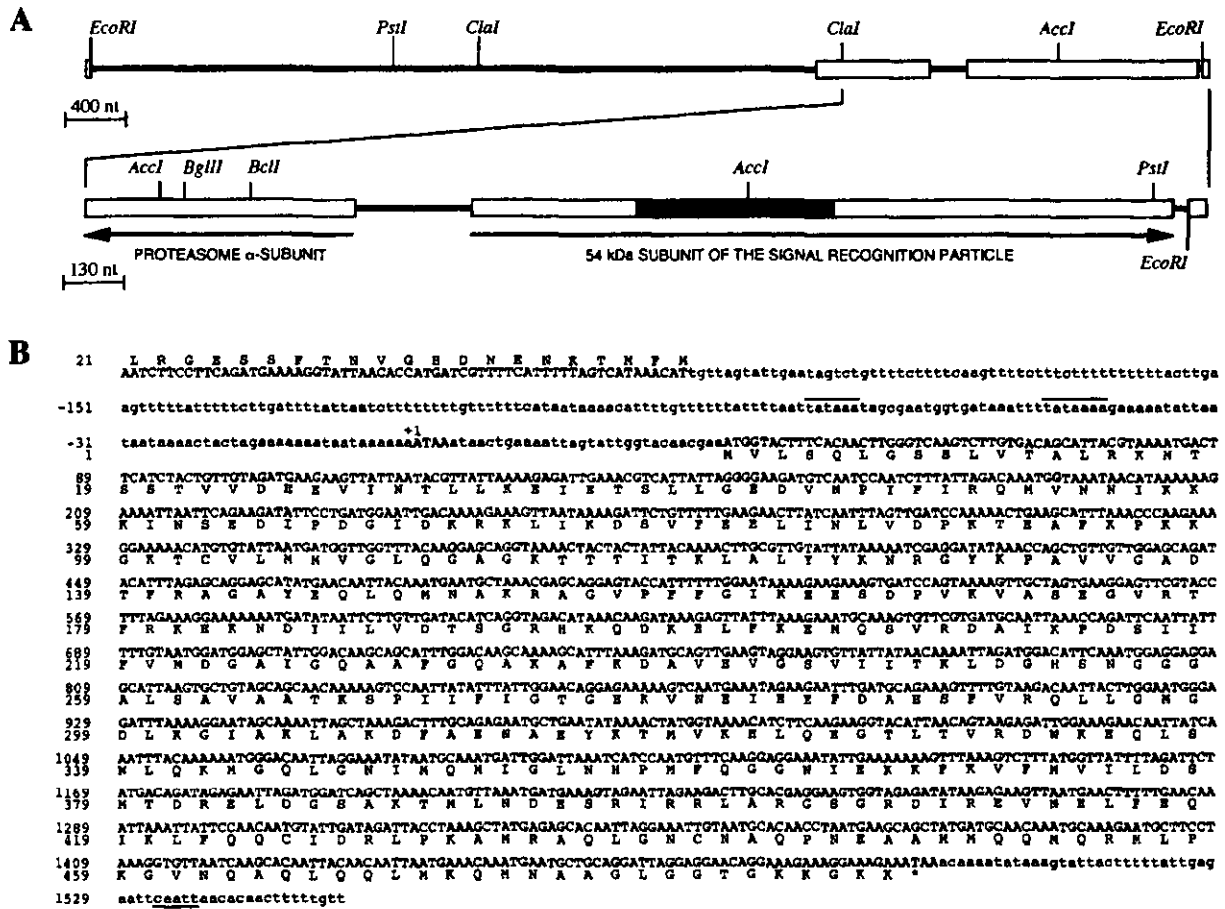


Fig. 1. The SRP54 gene from *E. histolytica*. (A) Schematic representation of the 7 kb genomic clone and the 2.3 kb subclone. The drawing shows the organization of the SRP54 and the proteasome α -subunit genes as well as relevant restriction sites. Arrows indicate the opposite orientation of these genes. The shaded area represents the hybridization region of the probe used for the screening and blotting analysis. (B) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence (one letter code) from the SRP54 gene. The intergenic sequence as well as the 5' coding sequence of the proteasome α -subunit gene are shown (the complete nucleotide sequence of this gene is available in the GenBank/EMBL databases under the accession number X99382 [29]). The protein coding sequences are in upper case and the intergenic sequence as well as the untranslated regions are in lower case (unless specified). Nucleotide and amino acid residues are numbered on the left of the sequence. Nucleotide +1, located at 34 bp upstream the ATG codon, is the transcriptional start site as determined by 5' RACE (see Fig. 2C). The nucleotide sequence contains an ORF encoding a polypeptide of 487 amino acids (stop codon is marked by an asterisk). The transcriptional start signal 'ATAA' is in uppercase. The two putative TATA-box-like sequences are overlined while the putative polyadenylation signal is underlined. The nucleotide sequence downstream from the *EcoRI* restriction site (position +1528 to +1533) was determined by 3' RACE and cDNA sequencing.

ica. At the 3' end, we used a sense primer that anneals to a region located at nucleotide position +1394 to +1413. The polyadenylation site was found at 55 bp downstream the stop codon (nucleotide position +1553; results not shown) as well as a typical polyadenylation signal at position

+1533 to +1537.

The BLAST analysis revealed a significant homology with plant, mammalian and yeast SRP54 sequences. In pairwise comparisons, the entamoebal predicted amino acid sequence was 47% identical to the tomato sequence and 46% identical to

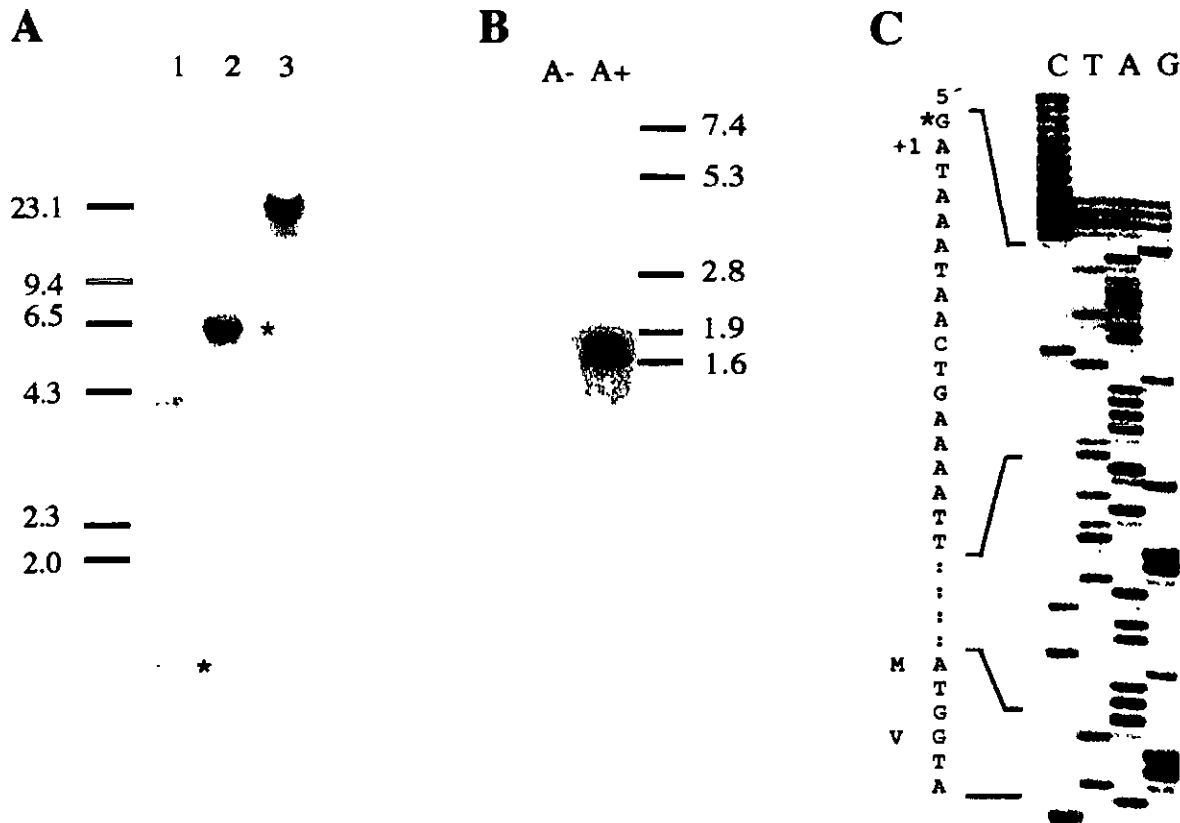


Fig. 2. Organization and transcription of the *E. histolytica* SRP54 gene. (A) Southern analysis. Genomic DNA (4 μ g/lane) was digested with [1] *AccI*, [2] *EcoRI*, or [3] *HindIII* endonucleases and restriction fragments were electrophoresed on a 1% agarose gel. The DNA fragments were transferred to a Nylon membrane. The probe used was the 440 bp PCR product (shaded region in Fig. 1A) radiolabelled by random primer extension. The set of expected bands are indicated by asterisks. Molecular weight markers are indicated in kilobasepairs. (B) Northern analysis. Polyadenylated [A⁺] and non-polyadenylated [A⁻] RNA (1 μ g/lane), dissolved in 2.2 M formaldehyde and 50% formamide, were loaded into a 1.2% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde in MOPS buffer. The RNA was transferred to a Nylon membrane and hybridized with the same probe as above. Molecular weight markers are indicated in kilonucleotides. (C) Mapping of the transcriptional start site. 7% acrylamide gel showing the nucleotide sequence of the 5' end from the SRP54 transcript using an antisense primer. The transcription starts at an A residue (at 34 bp upstream the ATG codon, indicated as +1). The extra G residue (not present in the genomic sequence, indicated with an asterisk) found at the transcriptional start site suggests that the SRP54 mRNA is a G-capped transcript. The sense nucleotide sequence as well as the deduced amino acid from the first two codons of the SRP54 ORF are indicated at the left of the gel.

the mammalian counterparts (dog and human), and with yeast homologues the identities were 44 and 39% (*S. pombe* and *S. cerevisiae*, respectively). While with the archaeobacterial and eubacterial sequences were 35 and 27% identical (*M. jannaschii* and *E. coli*, respectively) (see Fig. 3). These identities clearly indicate the degree of conservation of this protein.

The alignment of the entamoebal SRP54 with homologue sequences from other organisms

showed that the amoebic sequence contains the characteristic features of such proteins (Fig. 3). The highly conserved amino-terminal, G-domain, contains the consensus sequences for the GTP-binding motifs. Also present is the less conserved carboxy-terminal methionine rich (8.3% content), M-domain, responsible for the recognition and binding to signal sequences [5]. As in other SRP54 proteins, the *E. histolytica* homologue contains the G-domain sequence PIIFIGTGEKVNEI

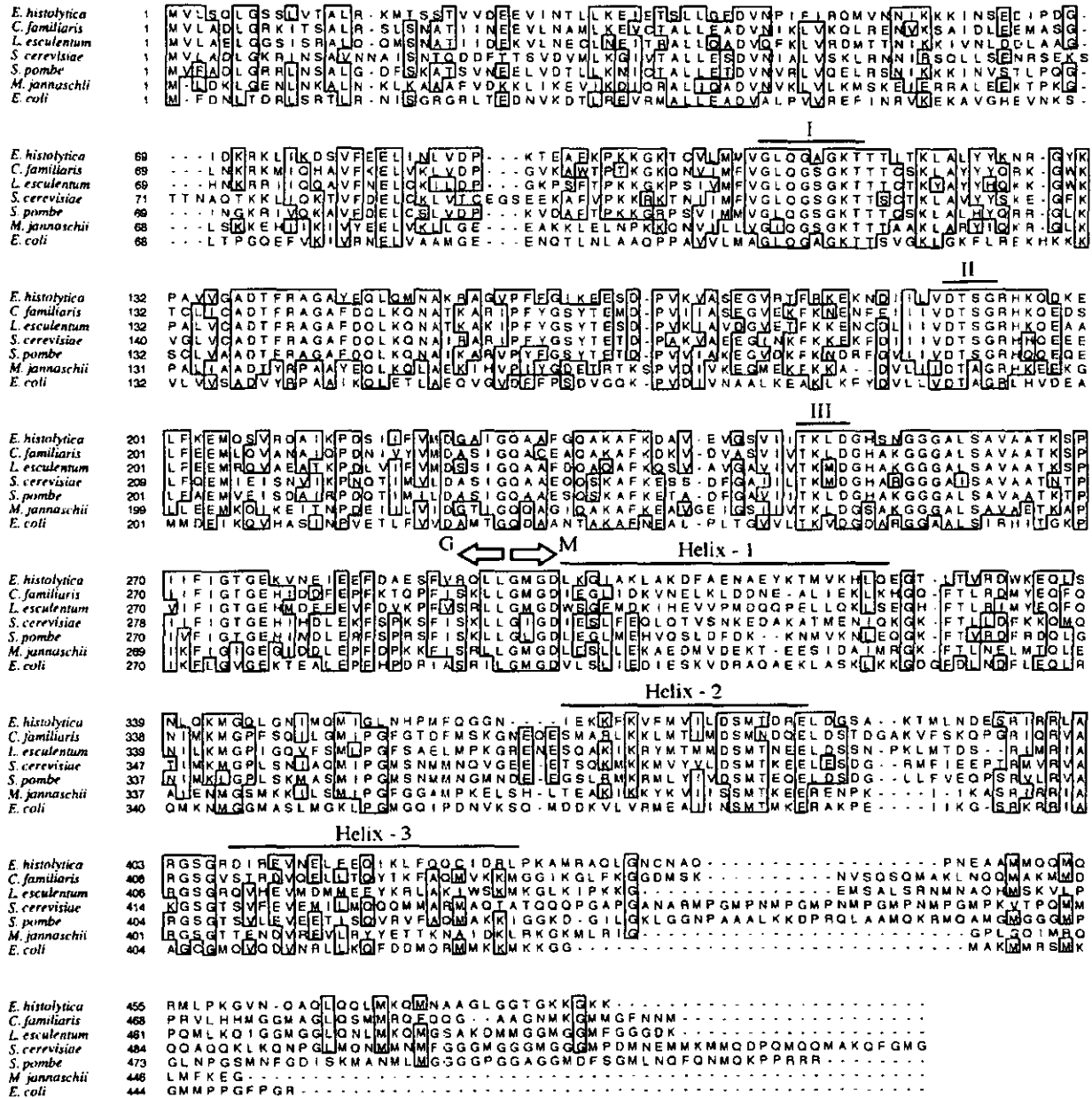


Fig. 3. Alignment of the deduced amino acid sequence of the *E. histolytica* SRP54 gene with selected homologues. The alignment was generated with the clustal W program [23] using the PAM protein weight matrix and the default gap and insertion penalty settings. The typical features of the SRP54-like G-proteins identified by homology are shown. The limit between the G- and the M-domain are indicated by arrows. The conserved GTP-binding motifs are indicated (I–III). The amphipathic α -helices, determined by secondary structure prediction, are indicated (Helix – 1 to – 3). Blocks denote conserved residues (one letter code). Gaps are indicated by dashes. The accession numbers of the used sequences are as in Fig. 4.

(amino acid positions 269–282), consistent with the consensus known as the SRP54-type proteins GTP-binding domain signature [6], while secondary structure analysis of the M-domain predicts the three amphipathic α -helices proposed as the signal sequence binding pocket [34].

Phylogenetic placing of *Entamoeba* is crucial in clarifying the evolution of early eukaryotes. In the phylogenetic trees inferred from complete small-subunit ribosomal RNA, the *E. histolytica* branch has been placed later in the eukaryotic tree (after *Euglena gracilis* and *Trypanosoma brucei*, both with mitochondria) [35], supporting the hypothesis that the absence of the mitochondria is likely due to a secondary loss. However, it has been suggested that the ribosomal RNA tree can sometimes be at odds with a protein tree derived from amino acid sequences [36,37].

To generate the phylogenetic trees based on the SRP54 protein family, a multiple sequence alignment was performed using the clustal W program [23] and the available protein sequence data. A modified version of the alignment was used. Since the G-domain is highly conserved and the secondary structures of the α -helices of the M-domain are functionally conserved, both were included in the analysis, while the carboxy-termini that varies in extension as well as the significant insertion and gapped regions were excluded. To make data more manageable, only one copy of the *A. thaliana* and *H. vulgare* homologues was utilized, since the copies are highly similar. Likewise, the human homologue was excluded since it is 100% identical to the dog sequence. The resulting amino acid alignment was used for phylogeny inference.

The phylogenetic relationships of the *E. histolytica* SRP54 protein were analyzed by distance matrix and maximum-parsimony methods. The trees obtained by both methods are topologically identical. The trees generated using distance algorithms were essentially similar, and compared with that produced by the parsimony method, only the plant and the fungi lineages were interchanged. Fig. 4 shows the tree inferred by the neighbor-joining algorithm. In this reconstruction two major groups are displayed, one comprising the archaea and eubacterial sequences and the other containing all the eukaryotic homologues. The tree reveals that

the *E. histolytica* sequence is an early divergence of the eukaryotic clade. This separation is supported by a high bootstrap value. Unfortunately, since the sequence data of SRP54 from *Trypanosoma*, *Giardia* and other protozoan species are not available yet, the present analysis is not directly comparable with those based on other proteins [38–41]. However, further sequence data on this protein family from several protozoa would provide additional insights regarding the evolution of the secretory pathway and the branching pattern of eukaryotic cells.

We have generated the first evidence that *E. histolytica* contains genes coding for key proteins involved in the secretory pathway. The molecular characterization of the entamoebal SRP54 gene constitutes an important first step in the elucidation of the mechanism that delivers amoebic proteins to the extracellular environment. Further experiments on the functional characterization of the amoebic SRP54 are currently in progress. The first approach we have undertaken involves the functional complementation of a *S. cerevisiae* mutant that has a disruption of the SRP54 gene [42], causing a slow growth phenotype that may be rescued by the entamoebal homologue. Heterologous complementation would provide new insights into the distribution and function of the secretory components in this parasite. On the other hand, the SRP54 of *E. histolytica* represents an eukaryotic protein that is more ancestral than its homologues present in plants, mammals and yeast, placing these amitochondrial protozoa on an early eukaryotic branch in agreement with the phylogenetic position revealed by sequence comparisons of other proteins. The results presented in this paper add further support to the hypothesis that the secretory pathway is conserved in all organisms.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM grant (209095). M.A.R. is the recipient of a post-graduate scholarship from CONACyT. P.M.L. was supported in part by a grant from the Howard Hughes Medical Institute (75191-527103). We are grateful to Alejandro Olvera and Felipe Olvera for their excellent technical assistance.

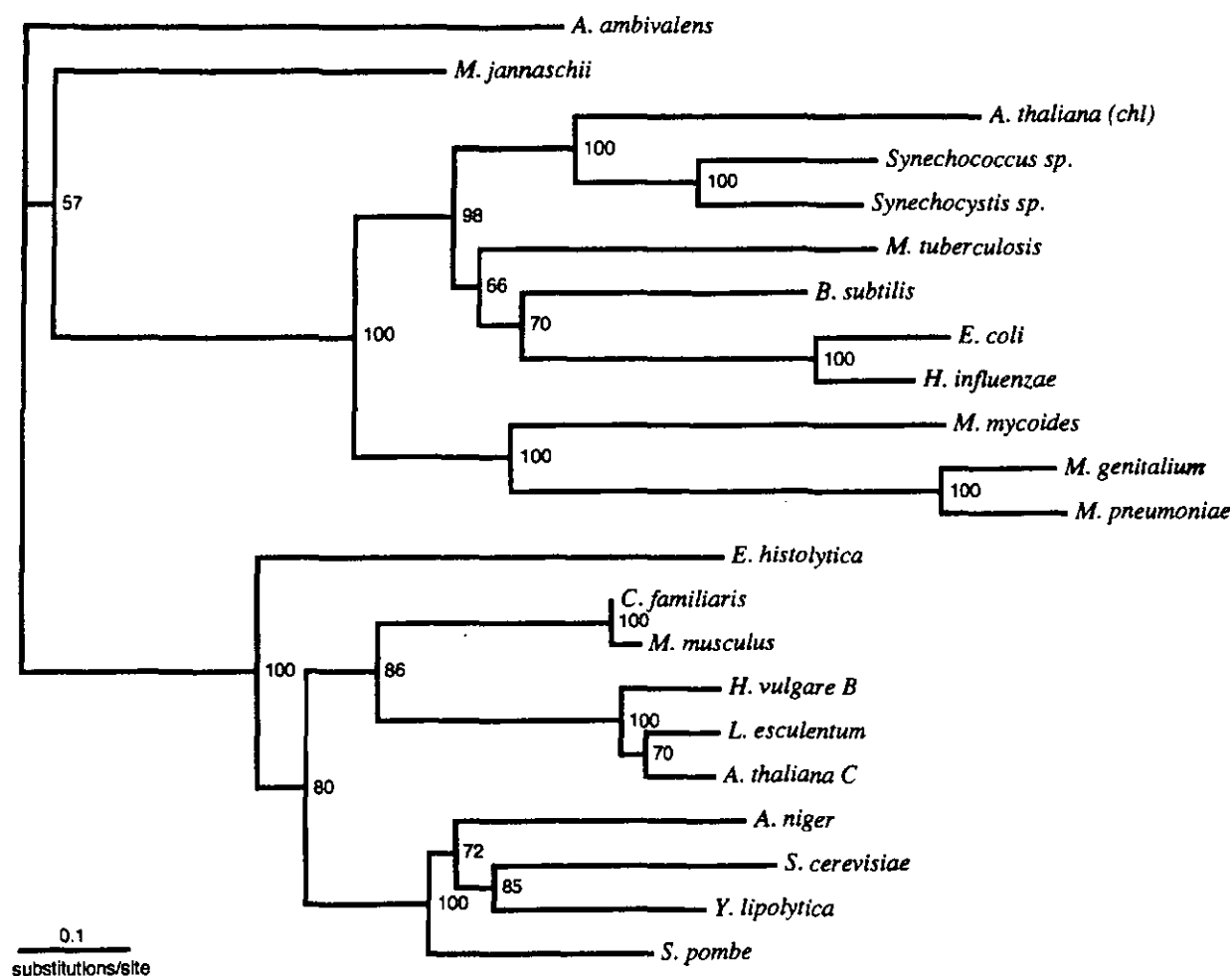


Fig. 4. Phylogenetic tree of the SRP54 protein family generated by neighbor-joining algorithm. Multiple sequence alignment of 22 SRP54 homologues was done with the Clustal W program [23] and edited manually. From the alignment, only conserved regions were used for phylogenetic analysis (see Section 2). A phylogenetic tree was then inferred by neighbor-joining analysis on distance measurements calculated according to the Dayhoff PAM substitution matrix using the PROTDIST and NEIGHBOR programs from PHYLIP package version 3.5 [24]. The tree was drawn using the public domain TREEVIEW program [26]. The horizontal length of each branch is proportional to the estimated number of substitutions. Significance of individual nodes (indicated in the internal branches) was calculated by conducting 100 bootstrap resampling replicates (see Materials and methods). The GENBANK/EMBL accession numbers of the used sequences are as follows. Eukaryotes: *Canis familiaris*, X16318; *Mus musculus*, X16319; *Arabidopsis thaliana* C gene, P49967; *Hordeum vulgare* B gene, L48285; *Lycopersicon esculentum*, Z34527; *Aspergillus niger*, L38317; *Saccharomyces cerevisiae*, X16908; *Schizosaccharomyces pombe*, M55518; *Yarrowia lipolytica*, U42418. Eubacteria: *Bacillus subtilis*, P37105; *Escherichia coli*, P07019; *Haemophilus influenzae*, L44752; *Mycoplasma genitalium*, P47294; *Mycoplasma mycoides*, M91593; *Mycoplasma pneumoniae*, U00089; *Mycobacterium tuberculosis*, Z74697; *Synechococcus* sp., X92071; *Synechocystis* sp., D90913. Archaeobacteria: *Acidianus ambivalens*, Y08735; *Methanococcus jannaschii*, L77117. Chloroplast: *Arabidopsis thaliana* (chl), Z21970.

References

- [1] Rothblatt J, Novick P, Stevens TH. Guidebook to the Secretory Pathway. London: Oxford University Press, 1994.
- [2] Becker B, Melkonian M. The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution. *Microbiol Rev* 1996;60:697–721.
- [3] Walter P, Johnson AE. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:87–119.
- [4] Walter P, Blobel G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7112–6.
- [5] Zopf D, Bernstein HD, Johnson AE, Walter P. The methionine-rich domain of the 54 kDa protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J* 1990;9:4511–7.
- [6] Althoff S, Selinger D, Wise JA. Molecular evolution of SRP cycle components: functional implications. *Nucleic Acids Res* 1994;22:1933–47.
- [7] Lütcke H. Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur J Biochem* 1995;228:531–50.
- [8] Bakker-Grunwald T, Wörstmann C. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* 1993;9:27–31.
- [9] Agrawal A, Pandey VC, Kumar S, Sagar P. Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NIH-200 and properties of the extracellular enzyme. *J Protozool* 1989;36:90–2.
- [10] McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:821–53.
- [11] Muñoz ML, Moreno MA, Pérez-García JN, Tovar GN, Hernández VI. Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules. *Mol Microbiol* 1991;5:1707–14.
- [12] Tannich E, Nickel R, Buss H, Horstmann RD. Mapping and partial sequencing of the genes coding for two different cysteine proteinases in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;54:109–11.
- [13] Leippe M, Tannich E, Nickel R, van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Müller-Eberhard J. Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* 1992;11:3501–6.
- [14] Tannich E, Ebert F, Horstmann RD. Molecular cloning of cDNA and genomic sequence coding for the 35-kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;55:225–7.
- [15] Purdy JE, Mann BJ, Shugart EC, Petri WA Jr. Analysis of the gene family encoding the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin 170-kDa subunit. *Mol Biochem Parasitol* 1993;62:53–60.
- [16] Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:431–2.
- [17] Pérez-Monfort R, Saavedra-Lira E. Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 1994;142:249–51.
- [18] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipmann DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [19] Rost B, Sander C. Combining evolutionary information and neural networks to predict of protein secondary structure. *Proteins* 1994;19:55–72.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [21] Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8998–9002.
- [22] Bähring S, Volker S, Lieber A, Strauss M. Mapping of transcriptional start and capping points by modified 5' RACE technique. *Biotechniques* 1994;16:807–8.
- [23] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [24] Felsenstein J. PHYLIP-phylogeny inference package. *Cladistics* 1989;5:164–6.
- [25] Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* 1988;22:521–65.
- [26] Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Appl Biosci* 1996;12:357–8.
- [27] Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B. Homology of the 54K protein of signal recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* 1989;340:478–82.
- [28] Hann BC, Poritz MA, Walter P. *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* contain a homologue to the 54-kD subunit of the signal recognition particle that in *S. cerevisiae* is essential for growth. *J Cell Biol* 1989;109:3223–30.
- [29] Ramos MA, Stock RP, Sánchez-López R, Olvera F, Lizardi PM, Alagón A. The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:131–5.
- [30] Bruchhaus J, Leippe M, Lioutas C, Tannich E. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* 1993;12:925–33.
- [31] Shinya E, Shimada T. Identification of two initiator elements in the bidirectional promoter of the human dihydrofolate reductase and mismatch repair protein I genes. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2143–9.

- [32] Hunt MD, Pettis GS, McIntosh MA. Promoter and operator determinants for fur-mediated iron regulation in the bidirectional *febA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin system. *J Bacteriol* 1994;176:3944–55.
- [33] Gavalas A, Zalkin H. Analysis of the chicken *GPAT: AIRC* bidirectional promoter for de novo purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem* 1995;270(5):2403–10.
- [34] Bernstein HD, Poritz MA, Strub K, Hoben PJ, Brenner S, Walter P. Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54 K subunit of signal recognition particle. *Nature* 1989;340:482–6.
- [35] Cavalier-Smith T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 1993;57:953–94.
- [36] Hasegawa M, Hashimoto T. Ribosomal RNA trees misleading?. *Nature* 1993;361:23.
- [37] Sogin ML, Hinkle G, Leipe DD. Universal tree of life. *Nature* 1993;362:795.
- [38] Hasegawa M, Hashimoto T, Adachi J, Iwabe N, Miyaka T. Early branching in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequences. *J Mol Evol* 1993;36:380–8.
- [39] Hashimoto T, Nakamura Y, Nakamura F, Shirakura T, Adachi J, Goto N, Okamoto K-i, Hasegawa M. Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondrial-lacking protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 1994;11:65–71.
- [40] Drouin G, Monia de Sa M, Zuker M. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J Mol Evol* 1995;41:841–9.
- [41] Keeling PJ, Doolittle F. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol Biol Evol* 1996;13:1297–305.
- [42] Hann BC, Walter P. The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* 1991;67:131–44.



ELSEVIER

Molecular and Biochemical Parasitology 84 (1997) 131–135

MOLECULAR
AND
BIOCHEMICAL
PARASITOLOGY

Short communication

The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene¹

Marco A. Ramos, Roberto P. Stock, Rosana Sánchez-López, Felipe Olvera,
Paul M. Lizardi, Alejandro Alagón*

Instituto de Biotecnología (UNAM), Avda. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México

Received 12 September 1996; accepted 30 September 1996

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Proteasome alpha; Molecular cloning

The fate of a protein inside a cell is usually determined by the set of proteases that perform its degradation to small peptides or free amino acids when it is no longer needed. Whereas constitutive structural proteins tend to be long-lived, pivotal regulatory proteins (e.g. cyclins) are rapidly degraded and turned over [1]. In general, proteases are specific for particular protein substrates, or mediate specialized functions. Proteases with broad specificities have to be tightly regulated, or at least physically compartmentalized (as is the case with lysosomal cathepsins), since they represent a danger to the pool of cytosolic proteins. In this context, the proteasome seems to have evolved as a specialized proteolytic system of wide specificity and tight

regulation, degrading, among others, ubiquitinated substrates in an ATP-dependent fashion. Thus, in the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum* and in higher eukarotic organisms, the biochemistry, as well as the primary and quaternary structures of the multicatalytic proteasome, has been conserved to an unusual degree, adding a new mechanistic class of proteases—those with a threonine as the active site residue—to the traditional classification of thiol-, seryl-, aspartyl- and metalloproteinases. The structural conservation, which involves 7-fold symmetric stacked ring structures composed of α - and β -subunits in arrays of varying composition and complexity [2], attests to the ancient origin of the proteasome and the severe constraints imposed on it for change. Its many functions in mammalian cells (i.e. antigen-processing) seem to have caused little divergence from its more primitive and (possibly) functionally restricted counterparts in unicellular microorganisms. Interestingly, disruption of single yeast proteasome genes is lethal in most cases [3].

Abbreviations: Pro- α , proteasome α subunit; SRP54, 54 kD protein subunit of the Signal Recognition Particle.

* Corresponding author. Tel.: + 52 73 291602; fax: + 52 73 172388; e-mail: alagon@ibt.unam.mx

¹ **Note:** Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the EMBL data base under the accession number X99382.

0166-6851/97/\$17.00 Copyright © 1997 Elsevier Science B.V. All rights reserved
PII S0166-6851(96)02770-3

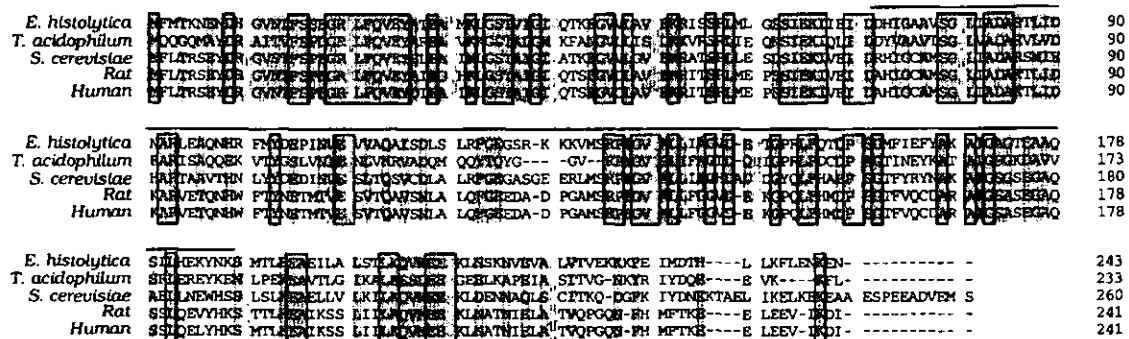


Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequence of the *E. histolytica* proteasome α subunit gene (EMBL accession number X99382) with those of human (X61970), rat (D10756), *S. cerevisiae* (X64918) and archaeobacterial (*T. acidophilum*, X59507) homologues. Boxed residues are identical and shading indicates conservative substitutions. The sequence spanned by the probe used in the hybridization experiments is overlined. Database searching and protein sequence alignments and homologies were carried out with the BLAST algorithm. Pairwise protein sequence alignments were done using the GeneWorks 2.45 package (IntelliGenetics) using the default gap and insertion penalty settings.

In this context, *E. histolytica* possesses a 20S proteolytic core (equivalent to the 20S core of the 26S mammalian proteasome). The existence of such a proteasome in *Entamoeba* has been proven biochemically in a recent study [4]. Protein metabolism in general, and in particular as it relates to signal transduction and cell cycle progression, is largely unexplored in this protozoan. Yet, a detailed exploration of the biochemical makeup is justified by the highly unusual cellular architecture of amoebas, which lack a morphologically distinguishable membranous tubular system equivalent to the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum and lysosomes of other eukaryotic cells [5]. Several proteases, most of them cysteine-type, have been reported, especially in their relationship to pathogenic phenotypes and tissue colonization and damage [6]. Therefore, although the internal compartmentalization of the amoebal cell is radically different—up to 40% of the cellular volume may consist of vacuoles of largely unknown function [5]—from that of other eukaryotes, the existence of a conserved proteasome strongly favours the idea that some of the regulatory pathways are evolutionarily well conserved, and that amoebas do possess a full complement of systems equivalent to those of higher eukaryotes, albeit highly modified.

In the process of sequencing a genomic clone containing the entamoebal homologue of the Signal Recognition Particle 54 kD protein subunit (SRP54) gene isolated with a probe obtained by PCR with degenerate primers (manuscript in preparation), we detected an open reading frame (ORF) upstream of, and oriented opposite to, the SRP54 gene. BLAST analysis revealed a significant homology with the α -subunit of proteasomal genes. The ORF is 732 bp long and codes for a protein with an expected molecular weight of 26.9 kD, consistent with the size range reported for other proteasomal proteins [7]. The predicted amino acid sequence is highly homologous to those of α -subunit genes (Fig. 1) and, surprisingly, the identities in pairwise alignments are highest with those of its mammalian counterparts (60.1% with rat and 60.5% with human), while with the archaeobacterium *T. acidophilum* and *S. cerevisiae* are of 39.5 and 53.8%, respectively. This is surprising, as a closer relationship to unicellular organisms (particularly yeast) could be reasonably expected. The orientation of the gene is peculiar in that it is oriented opposite to the immediately following SRP54 homologue of *E. histolytica*, as shown in Fig. 2C. This genomic organization is unusual in amoebas as most of the reported contiguous ORFs are in the same orientation [8]. This organization of the proteasome α and SRP54

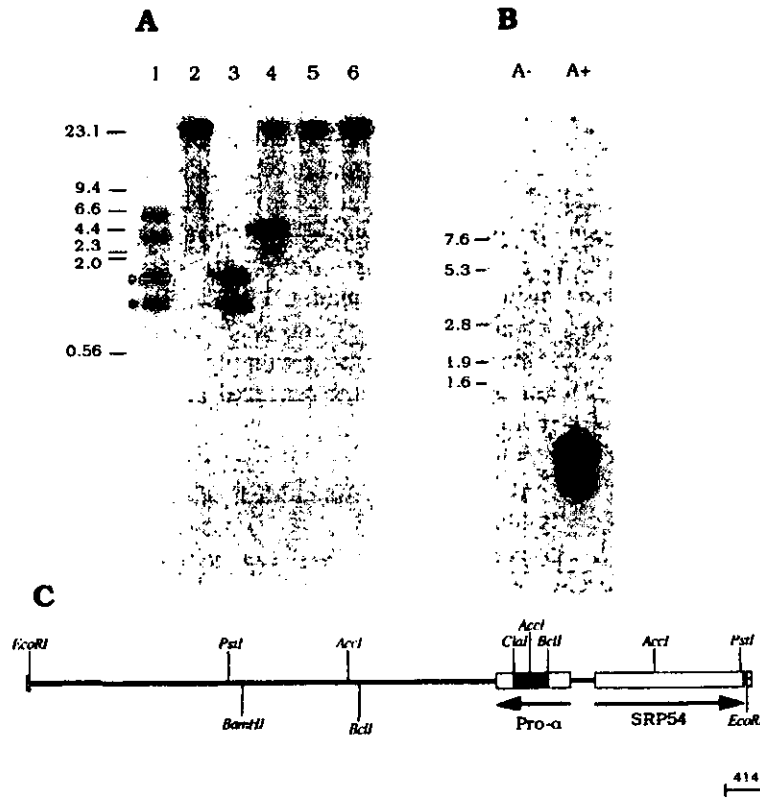


Fig. 2. (A) Southern blot of total *E. histolytica* DNA (2 µg/lane) digested with the following restriction enzymes: (1) Acc I, (2) BamH I, (3) Bcl I, (4) Pst I, (5) Sac I and (6) undigested control. DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel and alkaline-transferred to a nylon membrane. The probe used was the 350 bp Cla I-Bcl I fragment (Fig. 2C, shaded) labeled with [α - 32 P]dCTP by random priming and Klenow enzyme. (B) Northern blot analysis of polyadenylated (A +) and non polyadenylated (A -) RNA (1 µg/lane) with the same probe. (C) Restriction map of the genomic λ LAMP clone (strain HMI:IMSS, [13]) showing the cleavage sites of the enzymes used in Southern analysis and probe generation, the proteasome (Pro- α) ORF and the contiguous SRP54 ORF.

genes implies that some regulatory elements of transcription may be shared, overlapping, and, possibly, operate bidirectionally; the intergenic region between start codons being only 243 bp long. This type of arrangement has been explored in some detail in *Escherichia coli* [9]. The regulatory elements in the 5' untranslated region (5'-UTR) of the proteasome gene include a TATA-like element (TAATAAAA, position 14–21 of the reported sequence) and a consensus (ATTCA, position 84–88 of the reported sequence) found at the transcriptional start site of the majority of the reported *E. histolytica* genes [8]. The genomic organization of the proteasome gene was studied

by Southern blotting in strain HK-9 (Fig. 2A) [10]. Besides the set of bands (indicated by the asterisks) expected from the restriction map of the genomic clone shown in Fig. 2C, an extra set was obtained. These are, possibly, the result of cross hybridization between the genomic copies of the α -subunit and the similar β -subunit gene. Alternatively, the signals could represent an extra copy, an allelic variant, or another α -type subunit gene, as the fragment used as probe spans a highly conserved stretch of sequence (Fig. 1, overlined). As the ploidy of *E. histolytica* remains a matter of controversy, a final answer to this question awaits the characterization of other α and/or β proteasome genes in this parasite.

The *E. histolytica* α proteasome gene is transcribed as a polyadenylated RNA of approximately 1.1 kilonucleotides long, as determined by Northern analysis (Fig. 2B) [10]. The broad band detected may represent a highly abundant mRNA, consistent with the abundance reported for the protein, which in the mammalian cell may represent up to 1% of the total soluble protein pool [7].

The functions of the multicatalytic proteasome are just beginning to be understood, albeit in a general descriptive way. It has been shown that it functions in the rapid elimination of highly abnormal proteins, turnover of molecules involved in cell cycle progression (mitotic cyclins), and in the targeted destruction of molecules involved in signal transduction events (e.g. the I κ B inhibitor of NF κ B). The proteasome also serves as a catabolic tool utilized by cells during nutrient depletion, generating free amino acids by hormone induced ubiquitination and subsequent degradation of muscle protein (reviewed in [11,12]). In the case of *E. histolytica*, by analogy to the mammalian homologues, the 20S proteasome may be involved in events related to progression through the cycle leading to proliferation and/or differentiation into infective cysts, or as part of the signaling pathway of substrate recognition for the establishment in host tissues. Studies of the cellular machinery responsible for catabolism of proteins may provide the bases for better drug delivery systems, and the specialized entamoebal proteasome functions could possibly be exploited in the development of new drugs effective in the treatment of amoebal infection. This effort would be greatly aided by the characterization of the remaining genes coding for proteasome components and from a thorough characterization of the amoebal proteasome's differential biochemical properties. If *Entamoeba* is a relatively modern eukariote, its proteasome subunits may be able to complement conditional mutants of eukaryotes with mitochondria, such as yeast. If, on the other hand, *Entamoeba* is taken as a model of a primitive eukaryotic cell, as has been suggested [5], a study of the proteasome may shed some light on the evolutionary directions taken by cells as they evolved into higher level uni- or multicellular

systems. The higher identities with mammalian α -subunits could conceivably be a consequence of parasitism, either at the level of horizontal exchange or, alternatively, as an adaptation to the mammalian host's nutrient pool or signaling milieu. An exhaustive phylogenetic study [7] proposed a possible evolution of the 20S proteasome with the archaeobacterial one, composed of unique α - and β -subunits, near the origin, and the mammalian homologue—composed of at least seven α - and seven β -subunits—at the other. It will be most enlightening to clarify where in this scheme the amoebal proteasome is placed.

Acknowledgements

We wish to thank Alejandro Olvera for expert assistance in the culture of the amoebas and Dr Félix Recillas-Targa for helpful comments. This work was supported by DGAPA-UNAM grant number 209095.

References

- [1] Jentsch, S. (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26, 179–207.
- [2] Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwicki, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533–539.
- [3] Fujiwara, T., Tanaka, K., Orino, E., Yoshimura, T., Kumatori, A., Tamura, T., Chung, C.H., Nakai, T., Yamaguchi, K., Shin, S., Kakizuka, A., Nakanishi, S. and Ichihara, A. (1990) Proteasomes are essential for yeast proliferation—cDNA cloning and gene disruption of two major subunits. *J. Biol. Chem.* 265, 16604–16613.
- [4] Scholze, H., Frey, S., Cejka, Z. and Bakker-Grunwald, T. (1996) Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 271, 6212–6216.
- [5] Bakker-Grunwald, T. and Wostmann, C. (1993) *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today* 9, 27–31.
- [6] North, M.J., Mottram, J.C. and Coombs, G.H. (1990) Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 6, 270–275.
- [7] Coux, O., Nothwang, H.G., Silva Pereira, I., Recillas Targa, F. and Scherrer, K. (1993) Phylogenetic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol. Gen. Genet.* 245, 769–780.

- [8] Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C and Tannich, E. (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol. 12, 925–933.
- [9] Hunt, M.D., Pettis, G.S., McIntosh and M.A. (1994) Promoter and operator determinants for fur-mediated iron regulation in the bidirectional fepA-fes control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. J. Bacteriol. 176, 3944–3955.
- [10] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [11] Goldberg, A.L. (1995) Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. Science 268, 522–524.
- [12] Jentsch, S. and Schlenker, S. (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. Cell 82, 881–884.
- [13] Saavedra-Lira, E. and Pérez-Monfort, R. (1994) Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. Gene 142, 249–251.



Genomic Organization of a 7 Kb Gene Cluster from *Entamoeba histolytica*

Marco A. Ramos, Rosana Sánchez-López and Alejandro Alagón

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos, Mexico

Key Words: *Entamoeba histolytica*, Genomic organization.

Introduction

Entamoeba histolytica, the etiological agent of human amebiasis, has many unusual features regarding gene transcriptional control and genomic organization—many of the protein-coding sequences are transcribed unidirectionally, intergenic regions do not exceed 1.4 kb, the 5' and 3' untranslated regions of the mRNAs are short sequences, and intron sequences are seldom found (1).

Here we present the gene organization analysis of a 7-kb gDNA fragment isolated from an *E. histolytica* genomic library. This gene cluster contains several protein-encoding sequences. Southern and expression experiments were carried out, as well as sequence homology comparisons.

Materials and Methods

Cells. The *E. histolytica* HK9 strain was used unless otherwise specified. Trophozoites were cultured as described elsewhere. The *E. coli* strains used for routine molecular work were XL1-Blue and DH5 α .

Genomic library. The *E. histolytica* HM-1:IMSS genomic library, constructed in λ ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA, USA), was generously provided by Dr. R Pérez-Montfort. The genomic clone from where the sequences were obtained was isolated from this library.

Cloning strategy. The insert from the recombinant clone was amplified by long PCR using the eLONGase enzyme mix (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) using the DNA from the recombinant bacteriophage as template and universal primers. The long PCR product was digested by restriction endonucleases for enzyme mapping, and several restriction fragments were cloned into pBluescript SK-vector (Stratagene) for further sequencing using both universal

primers and primer walking strategy. The DNA fragments were sequenced using radioactive chain terminators and the ThermoSequenase Sequencing System (Amersham, UK). Extensive sequencing was performed with fluorescent chain terminators using the Taq FS Dye Terminator Cycle Sequence System and an Applied Biosystems automated sequencer.

Homology searching. Database searching was carried out with the BLAST algorithm via Internet (NCBI server). Pairwise comparisons were done with the BLAST2 algorithm using the default gap and insertion penalty settings. Multiple sequence alignment was performed using the CLUSTAL W program using the PAM protein weight matrix and the default gap and insertion penalty settings.

Nucleic acids blotting analysis. Southern and Northern Blot experiments were performed using standard protocols. Genomic DNA was obtained by cell lysis with lithium chloride and separation of nucleic acids on a cesium chloride gradient. Total RNA was prepared using TRIzol Reagent (Gibco BRL) following the manufacturer's instructions. The polyadenylated fraction was selected by oligo-d(T)-cellulose chromatography.

RT- and RACE-PCR. Reverse transcription was carried out with SuperScript II RT (Gibco BRL) using an oligo-(dT)-adapter primer or gene-specific primer. The cDNA was dG-tailed at the 3' end using dGTP and terminal deoxytransferase (Gibco BRL). The 3' end was PCR amplified using an adapter primer and gene-specific primers, while the 5' end was PCR amplified using an oligo-dC primer and gene-specific primers. The PCR products generated were blunt-end cloned into pBluescript SK-vector (Stratagene) for sequencing purposes.

Results and Discussion

Isolation and gene identification. During the sequencing of the 7-kb insert recombinant genomic clone where the entamebal *srp54* gene homologue was isolated (2), we de-

Address reprint requests to: Alejandro Alagón, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Tel.: (+52) (73) 114-691; FAX: (+52) (73) 172-388; E-mail: alagon@ibt.unam.mx

Presenting author: Marco A. Ramos.

tected an open reading frame at 244 bp upstream of the *srp54* gene. BLAST searching revealed significant homology with proteasome α -subunit genes (3). These findings suggested that probably other open reading frames were located near these genes. Nucleotide sequencing of the 7-kb insert has now been completed. This genomic fragment contains four open reading frames, including the entamebal homologues of the *srp54* and the proteasome α -subunit genes (2.5 kb of the insert). ORF FINDER analysis of the remaining 4.5 kb revealed the presence of two additional open reading frames. A GenBank database search using the BLAST algorithm showed that these open reading frames have significant homology to known protein-coding genes from other organisms. Both coding sequences share homology to serine-threonine kinases. One was named *yak1*, because it has high homology to the *yak1* gene product from *Saccharomyces cerevisiae*. The other, named *rac2*, was more similar to the *rac/PK* gene family from *Dictyostelium discoideum* and to a previously reported *rac/PK* family member, *rac1* gene, from *E. histolytica* (4).

Gene organization. The organization of this gene cluster is schematically represented in Figure 1. The *srp54* homolog and the α -proteasomal gene are transcribed divergently, and are separated by a 244-bp intergenic region. The proteasome gene and the putative serine-threonine kinases are transcribed in the same direction. The intergenic region between the proteasomal and the *yak1* genes is 1193 bp long, while the intergenic region from the *yak1* and the *rac2* genes is 310 bp long. The *yak1* and the *rac2* open reading frames are interrupted by an intron (discussed later).

Deduced amino acid sequence. The *srp54* gene encodes a protein with a theoretical molecular weight of 54.8 kDa, while the proteasome α -subunit, the *yak1*, and the *rac2* genes encode proteins with theoretical molecular masses of 27.2, 70.7, and 39.3 kDa, respectively.

Exon-intron analysis. The nucleotide sequence analysis of the genomic *yak1* gene shows interruption of the open reading frame at the amino-terminus coding sequence. A 56-bp

intron interrupting the protein-encoding sequence (frameshift from +1 to +3) at the ¹⁰⁶Thr-coding triplet was identified by RT-PCR and cDNA sequencing. Therefore, the genomic sequence of the *yak1* gene is 1883 bp long, while the spliced sequence is 1827 bp long. The genomic sequence analysis of the *rac2* gene was apparently started by an uncommon amino acid, because we could not identify a clear ATG start-codon at the first run-up of the genomic sequence analysis. Sequence of the 5' RACE product showed that this gene contains a 55-bp intron very near the amino-terminus coding sequence and a 7-bp mini-exon, which includes the ATG codon. The intron interrupts the open reading frame (frameshift from +1 to +2) at the ³Thr-coding triplet. Therefore, the genomic sequence of the *rac2* gene is 1099 bp long, while the spliced sequence is 1044 bp long. Both introns are short sequences, like other entamebal introns previously described, and contain the donor and acceptor consensus sequences (GT and AG) characteristic of introns.

Southern and expression analysis. The genomic organization and gene expression of the four structural genes were studied by Southern and Northern blotting, respectively. All genes are present in the *E. histolytica* genome as a single copy. The four genes are actively expressed as polyadenylated RNAs in the trophozoite stage of this parasite.

In conclusion, although the function of some of these genes remains to be elucidated, we have generated evidence that structural, highly expressed genes are close-packed, forming gene clusters in the *E. histolytica* genome. Furthermore, the sequences encoded on this genomic arrangement are proteins involved in highly conserved functions and cellular processes (e.g., SRP-mediated protein secretion, ubiquitinated-ATP-dependent protein degradation, and signal transduction).

Acknowledgments

We are grateful to A. Olvera and F. Olvera for their technical assistance. We also wish to acknowledge the oligonucleotide synthesis and sequencing facilities of the Instituto de Biotecnología (UNAM), Cuernavaca, Morelos, Mexico. This work was supported by DGAPA-UNAM Grant No. IN2097.

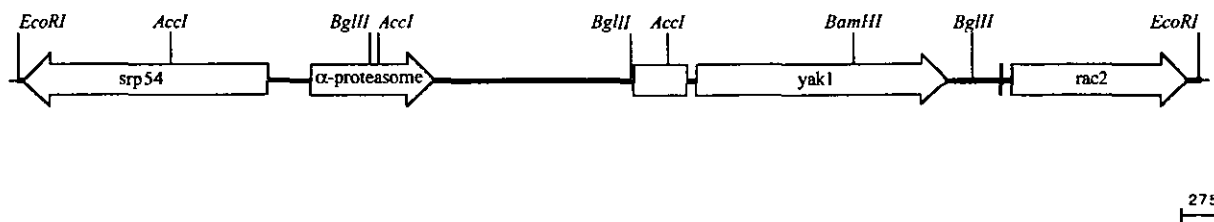


Figure 1. Gene cluster from *E. histolytica*. Schematic representation of the 7-kb genomic fragment from the recombinant clone. The drawing shows the organization of the *srp54*, α -proteasomal, *yak1*, and *rac2* genes as well as relevant restriction sites. Arrows indicate the coding sequence orientation of these genes.

References

1. Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C, Tannich E. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol 1993;12:925.
2. Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sánchez-López R, Stock RP, Lizardi PM, Alagón A. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. Mol Biochem Parasitol 1997;88:225.
3. Ramos MA, Stock RP, Sánchez-López R, Olvera F, Lizardi PM, Alagón A. The *Entamoeba histolytica* α -proteasome gene. Mol Biochem Parasitol 1997;84:131.
4. Que X, Reed SL. Expression and characterization of a rac family protein kinase of *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 1994; 66:111.