

19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "IZTACALA"

29/3/9

AISLAMIENTO DE UN POTENCIAL SUPRESOR TUMORAL. EN *Entamoeba histolytica*

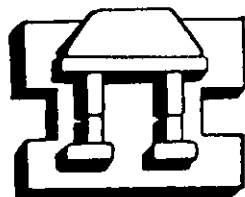
T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JESUS RAMSES CHAVEZ RIOS



IZTACALA

DIRECTOR: DR. MIGUEL ANGEL VARGAS MEJIA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE PROYECTO SE REALIZO DENTRO DEL
LABORATORIO - 2
DEPTO. DE BIOMEDICINA MOLECULAR.
CINVESTAV – IPN.

ASESOR:

DR. MIGUEL ANGEL VARGAS MEJIA.

AGRADECIMIENTOS.

A Dr. Miguel A. Vargas, por que me dedico su tiempo, me enseño lo más importante de la Investigación, me permitió conocerlo, y por dejar realizar mi trabajo en su laboratorio, además de su apoyo.

A la Dra. Rosaura Hernández por sus comentarios y sugerencias.

A Dr. Vianney Ortiz por brindarme su amistad.

A Dr. Bulmaro Cisneros que me mostró lo interesante de la Biología Molecular así como por brindarme su amistad.

A mi buen amigo Dr. Fernando García por enseñarme a valorar el trabajo y el estudio para realizarme.

A los Compañeros de laboratorio por su colaboración y apoyo profesional.

A todos mis profesores, compañeros de generación y de-generación por compartir tantos momentos y vivencias durante el curso de la carrera.

A Mónica, por ser una gran amiga, por brindarme su apoyo profesional y personal.

A mis Padres:

FIDE Y MARIO.

Por haberme brindado lo mejor de su vida, por acompañarme en los momentos más importantes de mi existencia, por regalarme momentos felices y tristes, por ser más que Padres; mis amigos ya que supieron darme un consejo e indicarme el camino correcto para superar los obstáculos que se presentan durante el curso de la vida; gracias por prepararme para superarme tanto personal como profesionalmente.

A toda la familia.

Por tenerlos tan cerca.

A mis hermanos (Gloria y Mario).

Por darme todo su apoyo durante el desarrollo de mi vida así como sus consejos y regaños.

A ti Verónica.

Por ser parte de mí y brindarme lo mejor de mi vida: mi pequeña Isis.

INDICE.

1.- RESUMEN	4
2.- INTRODUCCIÓN	5
2.1.- Generalidades	5
2.2.- Ciclo de vida <i>Entamoeba histolytica</i>	6
2.3.- Estructura	6
2.4.- Virulencia Amibiana	7
2.4.1.- Adhesión	7
2.4.2.- Fagocitosis	8
2.4.3.- Ameboporo	8
2.4.4.-Efecto Citopático y Citotoxico	9
3.- ANTECEDENTES	12
3.1.- Funcion extraribosomal de proteínas ribosomales	12
3.2.- Complejo AP-1 y proteínas relacionadas	15
4.- OBJETIVOS	19
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1.1.- Cultivo de <i>E. histolytica</i>	20
5.1.2.- Diseño de Oligos	20
5.1.3.- Amplificación parcial del gene <i>EhL10</i> a partir de λ ZAP II ..	20
5.1.4.- Secuenciación del inserto <i>EhL10</i> amplificado	20
5.1.5.- Marcaje de la sonda (<i>EhL10</i>)	21
5.1.6.- Purificación de la sonda (<i>EhL10</i>)	21
5.1.7.- Escrutinio sobre banco de cDNA de λ ZAP II	21
5.1.8.- Excisión in vivo	23
5.1.9.- secuenciación del gene <i>EhL10</i>	24
5.2.- Expresión de la proteína recombinante <i>EhL10</i>.	24
5.2.1.- Clonación del gene <i>EhL10</i> en vector de expresión pProEx ..	24

5.2.2.- Transformación en la cepa <i>E. coli</i> DH5 α	25
5.2.3.- Expresión, purificación de la proteína recombinante EhL10 ..	25
5.2.4.- Inmunización: Producción de anticuerpos α -EhL10	26
5.2.5.- Purificación de anticuerpos policlonales α -EhL10	26
5.2.6.- Inmunotransferencia de la proteína EhL10	26
5.3.- Obtención de proteínas ribosomales de <i>E. histolytica</i>	27
5.4.- Electroforesis Bidimensional	28
5.4.1.- Primera dimensión en gel cilíndrico	28
5.4.2.- Equilibrio del gel cilíndrico	28
5.4.3.- Segunda dimensión en SDS/PAGE	29
5.4.4.- Inmunotransferencia de proteínas ribosomales	29
6.- RESULTADOS	30
7.- DISCUSIÓN	46
8.- CONCLUSIONES	50
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 RESUMEN.

El trofozoíto de *Entamoeba histolytica* presenta una gran capacidad de invasión a tejidos, lo que nos sugiere que este protozoario presenta un fenotipo similar al de las células transformadas. La identificación de genes y proteínas en *Entamoeba histolytica* con homología a proto-oncogenes nos indican que podrían estar participando en la capacidad invasora y metastásica de la amiba. Así que el estudio de estos proto-oncogenes nos evidencia su presencia y su posible papel en la patogenicidad de este parásito.

El proto-oncogene *Jun* es un factor de transcripción que regula la expresión de un conjunto de genes que están implicados en la estimulación del crecimiento celular. *Jun* se une al DNA ya sea como heterodímero u homodímero con miembros de la familia *Jun* y *Fos*. Esta dimerización está mediada por la región del Zipper de Leucina de *Jun*. Recientemente mediante un rastreo en una librería de cDNA de fibroblastos de embrión de pollo, se aisló una proteína referida como *jif-1* (Factor de Interacción a *Jun*) la cual se une específicamente al zipper de leucina de *Jun*, dicha unión bloquea la interacción de *Jun* al DNA y por lo tanto inhibe la trans-activación de la transcripción mediada por *Jun*. Estudios recientes sugieren que *jif-1* está muy relacionada a la proteína ribosomal L10 de rata, y a la proteína QM de humano, la cual fue microinyectada en una línea celular tumorigénica (transferencia monocromosómica del cromosoma 11), dando origen al cambio del fenotipo tumorigénico a no-tumorigénico, de ahí que *jif-1* pudiera tener una función similar y una función dual: ser parte estructural del ribosoma y ser mediador de la transcripción a través de *Jun*.

Así que el estudio detallado de esta proteína sería muy interesante para entender la naturaleza invasiva de *Entamoeba histolytica*. En nuestro laboratorio se aisló una proteína a través de un rastreo en una librería de cDNA en *Entamoeba histolytica* con un segmento del gene *EhL10*. Durante la búsqueda se aislaron 8 clonas de las cuales sólo una contenía el gene completo, el cual es referido como la proteína ribosomal L10 de rata con una homología del 94%, como la proteína *jif-1* de pollo, y como la proteína QM de humano que es una proteína putativa supresora de tumores. *EhL10* codifica para una proteína de 23.9 kDa la cual por homología presenta una función de unión al zipper de leucina de *Jun*. La búsqueda en la base de datos GENBANK reveló igualdad de *EhL10* con proteínas homólogas a QM a partir de diversas especies de eucariontes, así como también el alineamiento de estas secuencias indica un alto grado de conservación en los primeros 175 aminoácidos cargados dentro de las regiones específicas de la proteína. El análisis de la estructura secundaria sugiere que éstas regiones forman α -hélices anfipáticas, una básica y la otra ácida, a parte de un dominio cargado que comprenden 30 aminoácidos del extremo amino-terminal y que es rico en prolina y aminoácidos básicos. Recientemente hemos encontrado que *EhL10* es parte estructural del ribosoma en *Entamoeba histolytica* mediante un ensayo de Western blot sobre proteínas ribosomales, y actualmente se está tratando de demostrar por ensayos de retardamiento y competencia la posible interacción con *Jun*.

2 INTRODUCCION.

GENERALIDADES.

Entamoeba histolytica es un protozooario entérico que provoca la amibiasis en el hombre, tiene la habilidad para invadir la mucosa del colon (Bekker-Grunwald and Worstmann, 1993), su invasión a los tejidos provoca colitis hemorrágica, disentería, abscesos hepáticos o lesiones en piel; este parásito además de invadir el hígado, alcanza a través de la vena porta el pulmón y el cerebro (Martinez-Palomo, 1982). Dicho organismo presenta distribución cosmopolita por lo que es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo provocando alrededor de 500,000 muertes al año y se ha estimado que el 10% de la población global esta infectada y por lo tanto es la tercer causa de muerte debida a un protozooario parásito, solo después de la malaria y la schistosomiasis (Walsh, 1988). Así mismo, el 10% de la población mundial infectada son portadores de amibas, las cuales por morfología parecen ser *E. histolytica*, lo que da origen al debate sobre la existencia de dos especies diferentes de *Entamoeba*, morfológicamente idénticas pero biológicamente distintas, y realmente la mayoría de estos individuos son infectados con amibas no-patógenas, recientemente referida como *E. dispar* (Diamond and Clark, 1993). Por otro lado poco menos del 10% de portadores de *Entamoeba*, albergan a *E. histolytica* siendo de alto riesgo para desarrollar la enfermedad invasiva. Así que la prevalencia de la amibiasis alcanza claramente el 50% de la población en algunos países desarrollados (Ravdin, 1995). Altos índices de infección amibiana ocurren en el sur-este de Asia, sur y oeste de África y en algunas áreas de Sudamérica y América Central. En México los datos epidemiológicos sobre la ocurrencia de la amibiasis son incompletos; estudios de corte seccional realizados sobre la prevalencia de portadores sintomáticos de quistes de *E. histolytica* revelan una prevalencia tan extrema del 50% en niños de 5-14 años de edad en una población de bajos recursos en la ciudad de México, del 1.8% en una población urbana en el estado de Michoacán, y del 24% en niños de 2-14 años en una población rural en Oaxaca (Navarrete-Espinoza y col., 1993). Dichos porcentajes de portadores de *Entamoeba* indica una notable diferencia entre la frecuencia de infección con *E. histolytica* y la ocurrencia de la amibiasis invasiva debido al factor por el cual *E. histolytica* esta comprendida dentro de dos formas genéticamente distintas (Horstmann y col., 1992). Mientras que ambas formas pueden infectar al hombre y además de habitar la cavidad del intestino bajo, solo una forma puede penetrar la mucosa y entrar a la circulación sanguínea para alcanzar varios órganos principalmente el hígado, resultando en la destrucción masiva del tejido hospedero. Para demostrar la conducta disparada de *E. histolytica* se han hecho esfuerzos para caracterizar molecularmente proteínas que son consideradas esenciales para la patogenicidad de las formas patógenas de *E. histolytica* (Ravdin, 1988; Horstmann y col., 1992).

Por lo tanto la amibiasis en México es una razón de esfuerzo en el cuidado de la salud. Por lo que, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) provee de atención social a más de la mitad de mexicanos y da tratamiento a mas de la mitad de un millón de casos de amibiasis intestinal por año. En dicha institución, la ocurrencia de la amibiasis así como la mortalidad han mostrado un decremento en años recientes (Treviño y col., 1994).

CICLO DE VIDA.

Entamoeba histolytica es un protozooario entérico que existe en cualquiera de las dos formas: quiste o trofozoíto. El ciclo de vida es relativamente simple (Fig. A), el inicio de la infección comienza con la ingestión del quiste por parte del hospedero que es la forma transmisible de la amiba, el cual se encuentra presente en agua o alimentos contaminados. Ya que el quiste es resistente a cualquier efecto adverso por parte del pH ácido del estómago, estos pasan a través del mismo y llegan al interior del intestino grueso donde sufren desenquistamiento (la pared del quiste es digerida por enzimas proteolíticas) dando origen a la forma reproductiva, el trofozoíto, el cual coloniza y se divide. Los trofozoítos se alimentan de bacterias y de restos celulares en el intestino grueso y se reproducen rápidamente por fisión binaria, permaneciendo como comensales. Por otro lado algunos trofozoítos migran río-abajo del intestino y forman de nuevo una pared quística la cual es requerida para protegerse de la desecación una vez que ellos han sido eliminados al medio ambiente por medio de la defecación, y así pudiendo infectar a otros hospederos humanos y completar su ciclo de vida (Guerrant, 1986). Dichos procesos de enquistamiento y desenquistamiento son totalmente desconocidos en *E. histolytica*. Por otro lado se ha observado que algunos trofozoítos tienen la capacidad de penetrar el tejido hospedero e invadir órganos, siendo el órgano blanco el hígado, además de invadir el pulmón y cerebro. Esta invasión es mediante la adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal provocando su lisis y por lo tanto penetrar a la mucosa intestinal, por lo que el resultado puede ser masivo e incluso una destrucción total del tejido hospedero (Ravdin, 1995).

El trofozoíto, la forma ameboidea del parásito se reproduce por fisión binaria en el colón, causando un daño al hospedero. Dos cambios en el desarrollo del parásito son críticos para la patogénesis del mismo, primero: cuando el parásito invade la pared del intestino y causa la disentería, ellos cambian la forma de crecimiento de anaerobio a crecimiento microaerófilo (Reeves, 1984); segundo: en respuesta a estímulos desconocidos algunos trofozoítos en el lumen colónico se convierten en quiste, la forma infecciosa del parásito, el cual tiene 4 núcleos con pared de quitina además de presentar un citoplasma reducido. Actualmente es poco el conocimiento acerca de la regulación del crecimiento por parte del parásito bajo condiciones anaerobias o aerobias, y nada se conoce del fenómeno de enquistamiento por parte del trofozoíto.

ESTRUCTURA.

Estructuralmente *E. histolytica* es un eucarionte simple: sin mitocondrias, peroxisomas y con un aparato de golgi poco desarrollado. Esto hace a la amiba un modelo de célula eucarionta primitiva (Bekker-Grunwald and Worstmann, 1993). Un trofozoíto de *E. histolytica* tiene un diámetro promedio de 25 μ m (10-60 μ m), contiene un solo núcleo de 3-5 μ m de diámetro el cual tiene además cromatina fina en la periferia y un nucleolo central. Por otro lado el diámetro promedio de un quiste es de 12 μ m (5-20 μ m), contiene de 1-4 núcleos dependiendo de su madurez. Quistes jóvenes uninucleados pueden contener trozos de glucógeno que se colorean con Yodo (que corresponde a reserva de alimento) y pueden también contener cuerpos cromatoides densos que consisten de ribosomas dentro de cristales ordenados. Además la pared celular del quiste es impermeable y esta compuesta de quitina (un polímero N-acetil-D-glucosamina). (Ravdin, 1995).

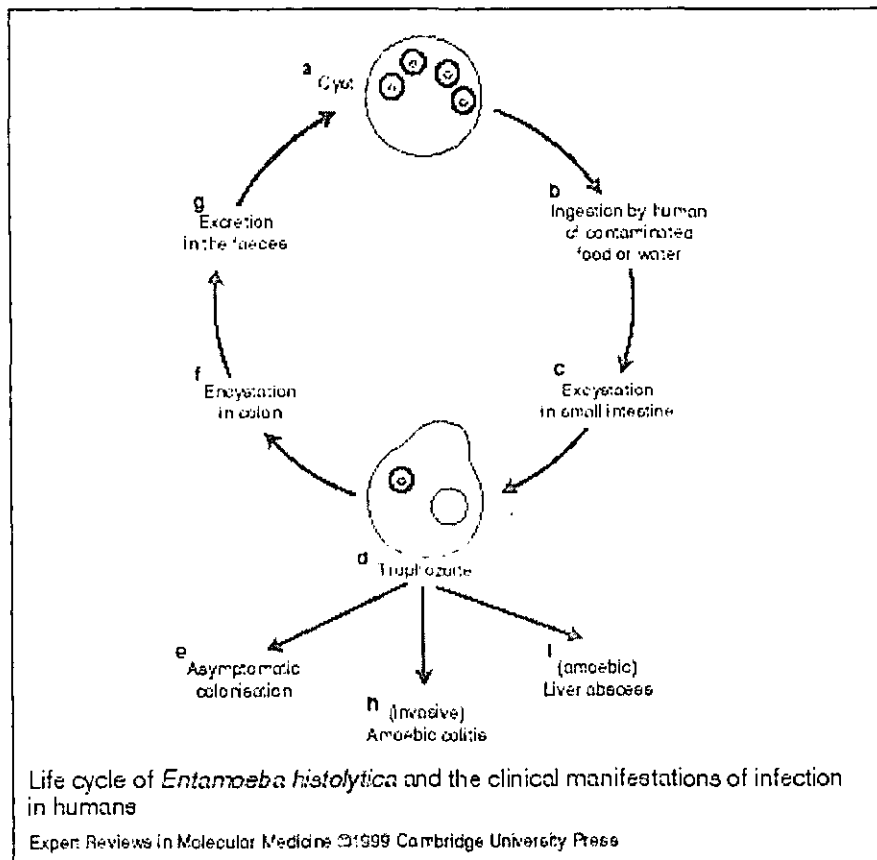


Figura A. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. *E. histolytica* es un protozoo que causa la amibiasis y abscesos hepáticos. Su ciclo de vida consiste de dos estadios: quiste y trofozoíto. (a) El quiste que típicamente contiene 4 núcleos; (b) son ingeridos vía agua o alimentos contaminados. (c) Durante el desenquistamiento en el intestino delgado realizan una división nuclear seguida de una citoplásmica, dando origen a 8 trofozoítos. (d) El trofozoíto contiene un sólo núcleo con un cariosoma central., Reside en el lumen del intestino delgado donde se adhieren hacia capas epiteliales y mucosa colonica. (e) Aproximadamente el 90% de individuos infestados por *E. histolytica* son colonizados sintomáticamente; (f) El enquistamiento de trofozoítos ocurre en el lumen de el colom, resultando en (g) la excreción de quistes mediante evacuaciones (heces fecales) y por lo tanto la continuación de su ciclo de vida. (h) Como alternativa, trofozoítos pueden invadir el epitelio intestinal provocando colitis amibiana. *E. histolytica* puede penetrar el epitelio y establecerse como una infección extraintestinal persistente (i) abscesos hepáticos.

VIRULENCIA AMIBIANA.

Los mecanismos de virulencia de *E. histolytica* permanecen aún desconocidos (Ackers, 1996). Estudios realizados con una gran variedad de modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo menos han identificado 5 tipos de moléculas que son responsables de varios daños tisulares y celulares causados por amibas patógenas: incluyendo Adhesinas (Petri y col., 1987; Rosales-Encina y col., 1987; Rodríguez y col., 1989; Mc Coy y col., 1994; García-Rivera y col., 1999), Ameboporos (Leippe y col., 1991; 1994_c; Leippe y Müller-Eberhard, 1994_a; Leippe, 1997), Fosfolipasas (Long-Krug y col., 1985; Ravdin y col., 1985; Vargas-Villareal y col., 1995), Colagenasas (Muñoz y col., 1982, 1984), y Proteínasas cisteínicas (Becker y col., 1988; Reed y col., 1989; Keene y col., 1990; Montfort y col., 1993; García-Rivera y col., 1999).

Así que el daño causado por trofozoitos virulentos involucra la destrucción y la degradación de diferentes estructuras celulares e intracelulares (Perez-Tamayo, 1986), las cuales probablemente requieren la acción simultánea o consecutiva de diferentes moléculas amibianas.

ADHESIÓN.

La adhesión a células blanco esta mediada por lectinas de superficie de *E. histolytica* (Ravdin, 1986). La destrucción celular es llevada a cabo por medio de la liberación de mediadores líticos incluyendo lipasas (Ravdin, 1986), proteinasas (Lauces, 1988; Tannich y col., 1991), péptidos formadores de canales (Leippe, 1992; Leippe y col., 1993), entre otras. Por lo tanto la adherencia de trofozoitos de *E. histolytica* hacia células blanco es el primer paso en el proceso de invasión y colonización de tejidos, así como en la citólisis dependiente de contacto y la fagocitosis. Así que los trofozoitos presentes en el lumen del intestino se adhieren, penetran la mucosa y destruyen el epitelio intestinal, dicho proceso es llevado a cabo por dos lectinas asociadas a membrana y por una adhesina de 112 kDa (Horstmann y col., 1992; García-Rivera y col., 1999).

La adherencia de los trofozoitos hacia mucinas, neutrófilos y células epiteliales en el colón es mediada por la galactosa o la lectina de superficie inhibible por N- Acetil- D- Galactosamina (Gal/Gal Nac Lectin) (Petri y col., 1987; Tannich y col., 1991). Dicha proteína es un heterodimero que consiste de una subunidad pesada de 170 kDa (Petri y col., 1989) y una subunidad ligera de 37 kDa (McCoy y col., 1993). De dichas subunidades, la pesada porta motivos estructurales que pueden ser importantes en conferir resistencia para la lisis por complemento (Braga y col., 1992), además de participar en la adherencia celular (Mann y col., 1993). Otros receptores amibianos involucrados en el reconocimiento celular han sido identificados, entre ellos la lectina de 220 kDa reconoce células epiteliales (Rosales-Encina y col., 1987) y una adhesina de 112 kDa (Arroyo y Orozco, 1987; García-Rivera y col., 1999), las cuales se unen a glóbulos rojos y participa en su fagocitosis. Recientemente se reportó que la adhesina de 112 kDa esta formada por dos proteínas: una de 49 kDa y otra de 75 kDa, las cuales están codificadas por dos genes diferentes y que estan separados por 188 pares de bases, mediante ensayos de caracterización y expresión de proteínas recombinantes, observaron que la proteína de 49 kDa es una proteasa cisteínica (EhCP112); mientras que la proteína de 75 kDa es referida como una adhesina (EhADH112) que tiene un dominio involucrado en la adherencia de trofozoitos a células blanco. Para demostrar que la Adhesina de 112 kDa esta compuesta por ambas EhADH112 y EhCP112, se realizó un ensayo de hibridación

invasivo podría estar regulado por cambios tanto en la célula invasora como en la célula huésped (Leroy y Col. 1995). Por otro lado este proceso invasivo se observó también en células de mamífero transformadas, además de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (Orozco y Col. 1994). En células de mamífero, la metástasis comienza con una invasión local del tejido que lo rodea y una vez que han penetrado los canales vasculares o linfáticos, pueden crecer en el sitio que penetraron o bien ser transportadas a otros tejidos (Benitez y Col. 1985).

3 ANTECEDENTES.

La síntesis de proteína en el ribosoma es una parte importante en la economía de la célula de levadura, en la que se consume acerca del 60% de la transcripción total y del 15% de la traducción total durante el crecimiento activo. Además es un proceso complejo que involucra la transcripción de más de 100 genes de RNA ribosomal por parte de la RNA pol I y la transcripción por parte de la RNA pol II de más de 100 genes de proteínas ribosomales (Woolford y Warner, 1991; Raué y Planta, 1991).

Esta síntesis de proteínas es coordinada por el ribosoma en todas las células. Este es un complejo ribonucleoproteico formado por un mRNA, tRNAs aminoacyl-peptidyl, y factores asociados a la traducción. El ribosoma esta dividido en dos subunidades: una grande que une moléculas de tRNA y media la transferencia hacia el sitio denominado peptidyl; y una subunidad pequeña que controla la unión del mRNA, la codificación y la fidelidad. Los ribosomas son complejas estructuras intracelulares que consisten de aproximadamente 85 proteínas ribosomales y de 4 RNAs ribosomales (Sollner-Webb y Tower, J., 1986; Sollner-Webb y Mougey, 1991). La estructura del ribosoma en bacterias ha sido estudiada por muchos años. Este es una partícula 70S que consta de una masa molecular de 2.3Mda. La subunidad pequeña 30S (S) contiene un rRNA 16S y 21 proteínas ribosomales; la subunidad grande 50S (L) contiene un rRNA 23S, un rRNA 5S y 34 proteínas ribosomales, algunas de las cuales son proteínas primarias de unión y son capaces de unirse firmemente hacia rRNA independientemente de otras proteínas ribosomales y por lo tanto se considera al ribosoma como una fuente rica de información sobre las interacciones RNA-proteína. Las proteínas ribosomales se clasifican de acuerdo a la subunidad en la cual residen (L o S) y por su movilidad en geles en dos dimensiones (Wittman, 1982). El número exacto de proteínas varia entre especies, en eucariotes las proteínas ribosomales son generalmente mas que las de bacterias; sin embargo, homologías entre los dos tipos es claramente evidente a partir de secuencias de aminoácidos.

Por otro lado, algunas proteínas ribosomales presentan la capacidad para unirse al DNA, considerando la perspectiva de: los dedos de zinc (Chang y col., 1993), bZIP (Chang y col., 1994) y los motivos de helice-vuelta-helice (Rice y Steitz, 1989), los cuales se han encontrado en proteínas ribosomales por lo que se cree que un número de proteínas tiene una segunda función a parte de estar presente en el ribosoma y en la síntesis de proteínas. Esta evidencia de la función extraribosomal putativa fue considerada en algunos estudios (Wool, 1993; Wool, 1995, 1996).

Función extraribosomal de Algunas proteínas ribosomales.

En el caso de la proteína ribosomal S20 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es homóloga a la proteína ribosomal S20 de rata y S10 de *Escherichia coli*; esta involucrada en la anti-terminación (participando como un factor de elongación transcripcional o como factor anti-terminación) por parte de la RNA polimerasa III (Denmat, y col., 1994). Otra proteína ribosomal de *Saccharomyces cerevisiae*, en este caso la L32, se ha demostrado que actúa a nivel del splicing *in vivo* de su propio transcrito del gene *RPL32*. L32 se une a sí mismo y a su propio RNA, y por lo tanto el splicing es bloqueado, sin embargo si se adiciona al complejo (L32 / RNAm) los primeros 75 aminoácidos del transcrito de *RPL32*,

se estimula específicamente el splicing del gene. Así que el transcrito *RPL32* se une a L32, formando un complejo con la ribonucleoproteína pequeña nuclear U1 (snRNP), que es el primer paso para formar el complejo de splicing. La presencia de L32 previene la asociación dependiente de ATP de la ribonucleoproteína pequeña nuclear U2 (snRNP) la cual es necesaria para formar el splicing completo (Vilardell y Warner, 1994). Para la proteína ribosomal L2 de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Xenopus leavis*, se han demostrado que participa en transducción y splicing; mientras que la proteína ribosomal L2 de *Saccharomyces cerevisiae* se une al RNA mensajero de L2 e inhibe su translocación (transducción); la otra proteína L2 se une al RNA pre-mensajero de L2 e inhibe el splicing en *Xenopus leavis* (Presutti, y col., 1991).

La proteína ribosomal S3 de mamífero, presenta una similitud con la endonucleasa III, la cual esta implicada en el daño al DNA, esta proteína forma parte del dominio del ribosoma que esta implicado en la iniciación de la traducción (Kim y col., 1995). Por otro lado se ha demostrado que la proteína ribosomal L32 de ratón esta relacionada con una proteína inductora de hueso (BIP), esta proteína induce la formación de cartílago y hueso endocondrial; y se ha comprobado por medio de anticuerpos contra la proteína L32 que esta implicada en la formación de hueso y cartílago con hematopoesis activa (Ito y col., 1992).

La proteína ribosomal RPS4 de humano esta codificada por dos genes distintos, RPS4Y y RPS4X. Se clonó el cDNA completo de estos dos genes homólogos, uno del cromosoma Y, el otro del cromosoma X. El mapeo de estos genes, demuestra que están relacionados con la señal de inactivación del cromosoma X (RPS4X) así como con el síndrome de Turner. Así que el fenotipo de Turner podría resultar en niveles reducidos de la proteína ribosomal S4 (RPS4), estos niveles podrían retardar la velocidad de ensamble de los ribosomas lo cual reduce la velocidad de síntesis de proteínas; por lo tanto la delección de un alelo del gene de la proteína ribosomal S4 esta implicada con el síndrome de Turner (Fisher y col., 1990; Watabe y col., 1993).

La regulación del gene RPS14 de humano se da a partir de: los RNAs antisentido del intron 1 del gene RPS14 (α -250 y α -280) que estimulan la transcripción del RNAm de S14 y por lo tanto esta representado como regulador positivo de la expresión del gene RPS14. En contraste, la proteína S14 inhibe la transcripción de su propio RNA mensajero a dos niveles: directamente a través de un efecto negativo sobre el complejo de transcripción del RNAm del gene RPS14 e indirectamente vía inhibición de la síntesis de RNA antisentido (Tasheva y col., 1994).

La proteína ribosomal S18 de *Arabidopsis thaliana* esta codificada por el gene PFL, por lo que una mutación en este gene provoca: la reducción en el peso seco y en la prolongación del ciclo de vida (Lysebettens y col., 1994).

En *Drosophila melanogaster* sé reportaron dos genes: un gene supresor de tumores letales (respuesta inmune aberrante: *air8*); este gene codifica para una proteína homóloga a la proteína ribosomal S6 de humano y a la proteína ribosomal S6 de rata con un 75.4% de identidad y con un 94.8% de homología . La expresión de este gene es bloqueada con la inserción de elementos P, lo cual provoca sobre-crecimiento de las glándulas linfáticas (órganos hematopoiéticos), diferenciación anormal de los glóbulos y

formación de tumores melanóticos, además de retardar el desarrollo, inhibir el crecimiento de muchos de los órganos larvales y conducir la letalidad larval. Estos resultados revelan una función regulatoria de esta proteína ribosomal de *Drosophila* y que puede ser relacionada a la inactivación de un alelo del gene que codifica para la proteína ribosomal S6, la cual ha sido fosforilada en respuesta a estímulo mitogenico; resultando en neoplasia hematopoiética (Watson y col., 1992; Stewart y col., 1993). Por otro lado, el otro gene reportado en *Drosophila melanogaster* que codifica para una proteína ribosomal de la subunidad pequeña S15a, se aisló por supresión de una mutante de *cdc33ts4-2* en levaduras deficientes en eIF-4E (factor de iniciación eucariótico-4F). El análisis del efecto de la sobre-expresión de la S15a de *Drosophila* sobre los niveles de la proteína eIF-4E nos indica una posible interacción entre estas dos proteínas. El gene de la proteína ribosomal es capaz de suprimir otros alelos de *cdc33* pero no la inactivación de la mutación, lo que sugiere que la supresión es dependiente de la presencia de la proteína eIF-4E sensible-temperatura. Así que la sobre-expresión de S15a de *Drosophila* suprime la mutación de *cdc33* por unión y estabilización de la mutante eIF-4E (Lavoie y col., 1994).

El herpesvirus Epstein-Barr virus (EPV), codifica para dos RNAs pequeños (EBERs) que son expresados en altos niveles durante la transformación de linfocitos B humano. Se reportó que una proteína celular llamada EAP (proteína de asociación a EBER) es conocida como proteína ribosomal L22. La unión de L22 hacia el ribosoma contra EBER1 podría suponer que L22 tiene un sitio de unión a RNA y es por lo tanto una proteína de unión directa a RNAr. Tentativamente, L22 puede ser ensamblada dentro del ribosoma vía interacción proteína-proteína, dejando su sitio de unión a RNA libre para reconocer algún otro RNA (RNAm o EBER1) (Toczyski y col., 1994). El gene de la proteína L22 se identifico como blanco de una translocación cromosomal en ciertos pacientes con leucemia (Nucifora y col., 1993), sugiriendo que los niveles altos de L22 son determinantes en la transformación celular.

La función que se ha reportado para la proteína ribosomal L7 de humano es que inhibe la traducción libre-celular en lisados de reticulocitos de RNAs mensajeros. La proteína ribosomal L7 contiene una región semejante a la región del zipper de leucina (bZIP), la cual esta mediando la alta afinidad para unirse a RNAm, RNA ribosomal 28S y para la formación de homodímeros; la interacción de L7 con su propio RNAm o con otros RNAm es un paso esencial en esta reacción, la cual es inhibida por anticuerpos dirigidos contra la región semejante bZIP de L7, y por medio de competidores de unión a RNAm. Por otro lado la transfección estable del cDNA de L7 en células de T-linfoma Jurkat, provoca que la síntesis de dos proteínas se suprima (una proteína nuclear y una proteína asociada al núcleo). La inhibición mediada por L7 de la traducción libre-celular de RNA poliA+ en células de T-linfoma es selectiva ya que la síntesis de la proteína de 46 kDa es suprimida. Así que el papel que se le atribuye a la proteína L7 de humano es que juega un papel regulatorio en el aparato de traducción eucariótico (Neumann y col., 1995).

Un numero de proteínas ribosomales tienen motivos de unión al DNA. Por ejemplo; las proteínas ribosomales de rata S27 y S29, las cuales presentan un dominio de unión al DNA referido como dedos de zinc (Chan, y col., 1993); elementos encontrados en proteínas aisladas a partir de ribosomas tanto de eubacterias, archeobacterias y organelos así como de eucariotes. Dentro de las proteínas de rata hay seis (S27a, S29, L34, L34a y HCEP80) que tienen dominios de dedos de zinc (Chan. y col., 1993; Wool, 1993). Por

otro lado en el extremo carboxi-terminal de la proteína ribosomal L12 de *Escherichia coli* tiene una estructura de hélice-vuelta-hélice (Rice y Steitz, 1989) la cual es muy semejante a las encontradas en proteínas que se unen al DNA y que regulan la transcripción (Steitz, 1990), y en proteínas ribosomales ácidas del tipo-P (PO, P1 y P2) que tienen un dominio de zipper de leucina (o hidrofóbico) (Landschulz, 1988) que son encontrados en factores de transcripción y que probablemente forman estructuras enrolladas que sirven o ayudan en la dimerización de proteínas. En el caso de la secuencia de la proteína ribosomal L13a de rata se encontró un motivo semejante al zipper de leucina y un elemento estructural semejante a la región básica del zipper de leucina (bZIP) en la proteína; este dominio podría además de permitir la unión al DNA, facilitar la dimerización entre proteínas (Chan y col., 1994). Para la proteína ribosomal L7 de humano, en el extremo amino-terminal (a.a 7 al 56) tiene un motivo bZIP, similar a los encontrados en factores de transcripción que se unen al DNA (Hemmerich, y col., 1993), este motivo se ha demostrado que media la dimerización de L7 y estabiliza la unión hacia el DNA y RNA.

A partir de un ensayo de interacción proteína-proteína (DIRE: rescate de interacción directa), en un sistema de doble híbrido de levadura, se aisló una clona de cDNA que codifica para la proteína ribosomal L18a de humano, dicha proteína presenta dos dominios semejantes al zipper de leucina (a.a 40-80, a.a 100-150) los cuales son candidatos para la interacción con *c-Jun*. Estos dominios podrían formar estructuras α -helices que son similares a las encontradas en otras proteínas, esta proteína L18a es capaz de restaurar la actividad de *c-Jun* y por lo tanto estos dominios están involucrados en la interacción con *c-Jun*. Así que L18a de humano, podría clasificarse como un "auxiliar" anti-oncogénico con un papel primario en la función ribosomal (Gramatikoff, y col., 1995).

Para la proteína ribosomal QSR1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Dick y col., 1997) que es el homólogo de la proteína ribosomal L10 de rata (Chan y col., 1996), y de la proteína QM de humano (Dowdy y col., 1991), se sugieren que es una de las últimas proteínas ensambladas dentro de la subunidad 60S del ribosoma y que es esencial para la unión de las dos subunidades del ribosoma: 60S y 40S (Eisinger y col., 1997). Además de ser el homólogo de la proteína *jif-1* de pollo (el homólogo QSR1 en pollo) se cree que podría interactuar con *c-Jun*; ya que se encontró que *jif-1* puede inhibir la formación de dímeros de *Jun/Jun* (Monteclaro y Vogt, 1993).

La función de las proteínas ribosomales fuera del ribosoma (extra-ribosomales) nos indican la capacidad que tienen estas para suprimir, regular y activar la transcripción de genes debido a los numerosos dominios de unión a DNA, RNA y Proteínas que se han encontrados en su estructura (Wool, 1996).

Complejo de transcripción AP-1 y proteínas relacionadas.

Así que se ha demostrado que el homólogo de la proteína QM en rata (la proteína ribosomal L10), y el homólogo en pollo (la proteína ribosomal L10/ *jif-1*) se unen a la región del zipper de leucina del factor de transcripción *c-Jun*, dicha interacción inhibe la unión de *c-Jun* al DNA y por lo tanto inhibe la trans-activación de la transcripción de promotores reguladores de AP-1 *in vitro* (Monteclaro y Vogt, 1993). Se conoce que el

complejo de transcripción AP-1 esta compuesto por diferentes combinaciones de dímeros formados entre los factores de transcripción "bzip" de la familia *Jun* y *Fos*. Estas proteínas son caracterizadas por una alta carga, un dominio básico de unión al DNA inmediatamente adyacente hacia un dominio de dimerización referido como "zipper de leucina" (Angel y Karin, 1991; Kouzarides y Ziff, 1989; Landschulz y col., 1988; Gentz y col., 1989). Dentro de la familia *Jun* hay tres proteínas (*c-jun*, *junB*, y *jun D*), y en la familia *Fos* hay cinco proteínas (*c-fos*, *fosB*, Δ *fosB*, *fra-1* y *fra-2*). Por un lado las proteínas de la familia *Fos*, pueden dimerizar con alguna de las tres proteínas *Jun* (*c-jun*, *junB*, y *jun D*), pero no pueden dimerizarse entre si mismo, y por otro lado para las proteínas de la familia *Jun* pueden formar homo y heterodímeros. Sin embargo, una proteína *Jun* forma homodímeros mucho más eficientes con alguna proteína *Fos* pero no consigo misma o con otro miembro de *Jun*, así que los dímeros entre *Jun* y *Fos* tienen mayor afinidad al DNA que los dímeros *jun-jun*. Dicha dimerización es requerida para la interacción eficiente con una secuencia blanco específica en el DNA: TGAC/GTCA, conocida como el elemento de respuesta a TPA (TRE) originalmente identificada en los promotores de los genes que codifican para la colagenasa y metallothioneina IIa y en el enhancer del polyoma virus (Lee y col., 1987a; Angel y col., 1987; Piette y col., 1987). Por lo tanto, los sitios de unión a AP-1 han sido encontrados en numerosos promotores y regiones enhancers.

El factor de transcripción AP-1 se encontró originalmente en células de humano como una actividad selectiva de unión hacia elementos enhancers en la región cis del virus SV40 del gene humano metallothioneina IIA y algunos otros genes vertebrados (Lee y col., 1987a; Angel y col., 1987). AP-1 se puede activar por promotores tumorales de esteroides de phorbol tales como 12-*O-tetradecanoylphorbol- β -acetato* (TPA) a través de la vía proteína cinasa C (PKC) (Angel y col., 1987; Lee y col., 1987b) A todo esto, ha quedado claro que AP-1 no es un simple factor de transcripción sino un complejo peptídico compuesto por diferentes miembros de la familia *jun* y *fos*, siendo *c-jun* el primer gene celular identificado para codificar para un trans-activador, similar a AP-1 (Bohmann y col., 1987; Angel y col., 1988), el cual es homólogo celular del oncogene viral *v-jun* (Maki y col., 1987).

El proto-oncogene *c-jun* codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de un conjunto de genes, además de ser componente del complejo de transcripción AP-1 (proteína activadora 1), el cual esta implicado en la regulación de diversas funciones celulares, tales como: proliferación diferenciación, transformación y apoptosis. AP-1 es un dímero que consiste de diferentes subunidades, ejemplo, proteínas de la familia *Jun* (*c-Jun*, *JunB* y *JunD*) y de la familia *Fos* (*c-Fos*, *FosB*, *Fra1* y *Fra2*) así como CREB/ATF y proteínas Maf (Bohmann y col., 1987; Angel y col., 1988b; Vogt y Bos, 1989, 1990). AP-1 regula la transcripción de algunos genes por medio de la unión específica hacia la secuencia de DNA (TGACTCA) y por variaciones de este motivo (Angel y col., 1987; Lee y col., 1987^{ab}). El complejo de transcripción AP-1 contiene además el producto de otro proto-oncogene, *c-fos* (Rauscher y col., 1988b; Bohmann y col., 1989; Curran y col., 1989). La proteína *jun* se une al DNA en forma de homo o heterodímero con miembros de la familia *Jun*, con miembros de la familia *Fos*, con factores de transcripción no-relacionados y con proteínas reguladoras (Vogt y Bos, 1990). Por lo tanto las proteínas *jun* y *c-fos* forman un heterodímero a través de una region rica en leucinas presentes en ambas y que es referida como zipper de leucina (Halazonetis y col., 1988; Kouzarides y Ziff, 1988; Nakabeppu y col., 1988; Rauscher y col., 1988a; Gentz y col.,

1989; Turner y Tjian, 1989). Ambas proteínas *c-jun* y *c-fos* contienen dominios funcionales que contribuyen a la unión al DNA y la regulación de la transcripción, sin embargo, solo *c-jun* es capaz de formar homodímeros que exhiben actividad funcional (Rauscher y col., 1988^a; Turner y Tjian, 1989). Cabe mencionar que *v-jun* y *c-jun* exhiben algunas diferencias estructurales en sus secuencias codificadoras y no-codificadoras (Nishimura y Vogt, 1988). Dichas diferencias funcionales de *v-jun* y *c-jun* han revelado que al igual que *c-jun*, *v-jun* se une específicamente hacia el sitio blanco AP-1 del DNA (Bos y col., 1988), y que puede activar la transcripción a partir de promotores blancos de AP-1 (Angel y col., 1988b) además formar un complejo con *c-Fos* (Bos y col., 1989).

Así que la habilidad de las proteínas *Fos*, *Jun* y de otros factores relacionados a AP-1 para formar heterodímeros con alguna otra proteína y con un alto grado de variación en la afinidad ha permitido sugerir un modelo para la activación de la transcripción de genes por AP-1. Esto podría permitir a proteínas de varias familias que son parte del complejo de transcripción AP-1, la regulación de la respuesta celular por estímulo vía tipo diferencial de formación de heterodímeros, unión a DNA y la activación transcripcional, y los sitios de unión a AP-1 involucrados (Ryseck y Bravo, 1991). Este modelo sugiere que diferencias en particular en miembros de la familia AP-1 puede tener muchos efectos específicos. La evidencia que respalda a este modelo viene a partir de estudios recientes en los que demuestran que una mutación nula en *c-Fos* trae como consecuencia un número de diferencias tejido-específico de su función; algunas de las más llamativas de estas deficiencias ocurren en el hueso y en el sistema nervioso central (Johnson y col., 1992; Wang y col., 1992).

Las interacciones entre proteínas son mediadas por zippers de leucina, lo cual ha sido postulado por tener un efecto inhibitorio. Se han hecho estudios para estos reguladores por medio de un screening sobre una biblioteca de cDNA de embrión de pollo con un anticuerpo biotinilado; durante el ensayo se encontró una proteína *jif* (factor de interacción a *Jun*). Dicha clona codifica para una proteína de 25 kDa referida como *jif-1* que se une específicamente en la región del zipper de leucina de *Jun* e inhibe la unión de *jun* hacia al DNA y por lo tanto la transactivación de la transcripción (Monteclaro y Vogt, 1993). La proteína *jif-1* esta muy relacionada con la proteína QM de humano con un 94% de homología y por lo tanto a la proteína ribosomal L10 de rata (Chang y col., 1996) con un 94% de homología, así que *jif-1* es homólogo a la proteína L10 de rata y de esta forma a la proteína ribosomal L10 de pollo. Realmente no es difícil imaginarse que la habilidad de la proteína ribosomal L10 de pollo (*jif-1*) se pueda unir a *Jun* y pueda suprimir la expresión de genes, lo que permite pensar de igual forma sobre la actividad supresora de tumores de la proteína QM de humano; referida también como proteína ribosomal L10 (Chang y col., 1996). Por otro lado, el conocimiento sobre la función(es) de la proteína QM no es muy amplio, excepto, sobre la posible interacción de la proteína QM con la proteína *Jun*, la cual provoca una inhibición sobre la actividad de la activación transcripcional por parte de *Jun* (Monteclaro y Vogt, 1993), se menciona una posible interacción ya que este tipo de interacción se ha mostrado ser un artefacto experimental (Loftus, 1996; Loftus y col., 1997). Recientemente el equivalente de QM en levadura, llamado QSR1 ha demostrado que se asocia con la subunidad ribosomal 60S y que esta involucrada en la subunidad de unión (Eisinger y col., 1997).

El cDNA de la proteína QM de humano fué originalmente clonado por hibridación entre una línea de células tumorigénicas del tumor de Wilms' (G401), y un híbrido microcelular no-tumorigénico (G401.6) durante una investigación para el gen supresor del tumor de Wilms' (Dowdy y col., 1991). El gen QM de humano codifica para una proteína hidrofílica, básica, citosólica con un peso molecular de 25 kDa (Dowdy y col., 1991; Kaneco y col., 1992; Van Ouweland y col., 1992). Por lo tanto varios cDNAs de diferentes proteínas QM han sido clonados a partir de diversas especies de los reinos plantae, animalia y fungi (Farmer y col., 1994). La comparación de secuencias entre varios cDNAs de QM indican que la proteína QM ha sido altamente conservada a través de la evolución eucariótica, por ejemplo... la QM de murino y humano difieren por solo un aminoácido, la proteína QM de humano y de Ratón son idénticas en todos sus aminoácidos excepto en un residuo Ser 202 en el humano el cual es reemplazado por un Asn en el Ratón (Farmer y col., 1994). Este grado de conservación es indicativo de que el producto de un gene proporciona una función esencial *in vivo*.

El papel de QM actualmente es desconocido; sin embargo algunos estudios sugieren que la proteína QM juega un papel importante en la célula normal. El homólogo de QM en pollo, *jif-1*, fue reportado por interactuar con el proto-oncogén *c-Jun* y por inhibir la trans-activación de promotores reguladores de AP-1 *in vitro* (Monteclaro y Vogt, 1993). Sin embargo, estudios realizados en sistemas experimentales indican que QM es una proteína citoplasmática y estudios de fraccionamiento celular tanto de levadura como de humano, indicaron que QM se localiza en el retículo endoplasmático rugoso y está asociada a ribosomas (Eisinger y col., 1997; Loftus y col., 1997). Algunos estudios sugieren que la interacción propuesta entre QM/*jif-1* y *c-Jun* en la regulación de la activación de promotores contenidos en AP-1 puede ser un artefacto experimental (Loftus, 1996). En otros estudios, QM ha sido reportada como poco regulada durante la diferenciación de adipocitos (Eisinger y col., 1993). Sin considerar el papel (es) del producto del gen QM, esta proteína (QM) proporciona una función esencial en levadura, ya que una delección de QM es letal (Koller y col., 1996; Tron y col., 1995). Por otro lado el cDNA de QM de humano puede funcionar para rescatar esta letalidad, indicando que el alto grado de conservación evolutiva observada entre homólogos de QM obtenidos a partir de especies tan diversas como levaduras y humano son funcionalmente significativa. Estudios previos de expresión indicaron que el transcrito de QM es detectable en muchos tejidos de mamífero y líneas celulares (Dowdy y col., 1991; Kaneco y col., 1992). Se ha observado que el gene QSR1 es esencial en levadura y que en mutantes sensibles a temperatura, son deficientes en la traducción de proteínas. Se ha demostrado también que la proteína QM está asociada a ribosomas en células de mamífero (Loftus y col., 1997; Nguyen y col., 1998). Dada la conservación extrema de QM (Farmer y col., 1994) y su papel en la síntesis de proteínas en levadura, permite suponer que la proteína QM puede ser expresada en todas las células que están sintetizando proteínas. Por otra parte se ha reportado que la proteína QM es una proteína novedosa de unión a zinc y que puede ser fosforilada por la proteína cinasa C *in vitro*. Esto hace parecer que la proteína QM puede contener un nuevo dominio de unión a zinc; y tal unión es necesaria para la interacción con *c-Jun*. Además, QM es fosforilada por la PKC y la extensión de la fosforilación por la PKC es correlacionada con el punto de inhibición de la unión de QM hacia *c-Jun* (Inada y col., 1997).

A partir de los antecedentes presentados sobre algunas proteínas involucradas en los mecanismos de transcripción celular y regulación de la misma y partiendo del hecho de que se conoce poco sobre proteínas amebianas que pudieran tener funciones similares a las descritas anteriormente como sería la supresión tumoral, es por eso que nos interesa aislar y expresar el producto del gene *EHL10* de *Entamoeba histolytica* como un posible potencial supresor Tumoral.

Para lo cual nos planteamos cubrir los siguientes objetivos:

4 OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

*CARACTERIZAR MOLECULARMENTE EL GEN *EhL10* DE *E. histolytica*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

*AISLAMIENTO DEL GEN *EhL10* DE *E. histolytica*.

*SECUENCIACION DEL GEN *EhL10*.

*EXPRESIÓN DEL GENE *EhL10* EN EL VECTOR DE EXPRESION pProEX-HTc Y PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEÍNA *EhL10*.

*AISLAMIENTO DE PROTEINAS RIBOSOMALES TOTALES DE *E. histolytica*.

*LOCALIZACION DE LA PROTEINA *EhL10* EN EL PATRON ELECTROFORETICO BIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES DE *E. histolytica*.

5

MATERIALES Y METODOS.5.1.1.- CULTIVO DE *E. histolytica*.

Los trofozoítos de la cepa amibiana de *E. histolytica* HMI: IMSS se cultivaron axénicamente a 37°C en medio TY1-S-33 (Diamond, 1978) suplementado con 20% de suero completo de bovino adulto (Microlab), inactivado a 56°C durante 30 minutos a baño María, al cual se le adicionó una mezcla de vitaminas al 3% (In vitro). El cultivo se incubó hasta una fase logarítmica de crecimiento.

5.1.2.- DISEÑO DE OLIGO DEGENERADO.

El oligo con el cual se amplificó un segmento del gen *EhL10* a partir de DNA genómico de *E. histolytica* (act/a ggt/a atg aga/t gga gct/a tgg) se diseñó basándose en el uso de codones de *E. histolytica* (Tannich y Hosrtmann, 1992).

5.1.3.- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA Sonda HOMOLOGA AL GEN *EhL10* DE *E. histolytica* SOBRE UN BANCO DE cDNA DE λ ZAP II.

Los oligos que se utilizaron para amplificar parte del gen *EhL10* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, 1990) sobre un banco de cDNA de λ zap II fueron, el oligo degenerado A12 y el oligo T7. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l. Se mezcló 10 μ l de buffer 10x con MgCl₂, 20 μ l de dNTPs a 50 μ M, 10 μ l de cada oligo a 50 μ M, 1 μ l de cDNA de λ Zap II como templado, 50 μ l de agua estéril, y 0.5 U de enzima taq polimerasa. Las condiciones para la PCR fueron de 35 ciclos con tres temperaturas: una de 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de los primers a 49°C por 30 segundos y una temperatura de extensión para la taq polimerasa de 72°C durante 1 minuto, terminados estos ciclos de la reacción, una temperatura suplementaria de extensión para la taq se realizó a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y se purificó por medio del kit de extracción de geles Jet Sorb (GENOMED).

5.1.4.- SECUENCIACION DEL SEGMENTO AMPLIFICADO DEL GEN *EhL10* POR PCR.

Para la secuenciación de nucleótidos del inserto amplificado y purificado se utilizó la técnica de secuenciación mediada por dideoxinucleótidos (Sanger, 1977), por medio del kit de secuenciación T7 SEQUENASE (Amersham LIFE SCIENCE). Para dicha reacción de secuencia se tomó como templado 3 μ l del inserto amplificado por PCR, se ajustó a un volumen de 8 μ l con agua estéril, al cual se le adicionó 2 μ l de NaOH 1M, y 1 μ l de primer a 50 μ M (A12, T7) siendo una mezcla para cada primer. Se incubó a 37°C por 10 minutos y se colocó en hielo. Después a la mezcla se le adicionó 2 μ l de HCL 1M y 2 μ l buffer de reacción del plasmido para un volumen final de 15 μ l, se incubó el templado/buffer/primer a 37°C por 10 minutos y se colocó en hielo.

Durante la incubación se preparó la mezcla apropiada de cada par de base (G, A, T, C) con 2.5 μ l de cada par de base y se incubó a 37°C, por otro lado se preparó la dilución del labeling mix tomando 2 μ l del labeling mix en 8 μ l de agua. Transcurrido el tiempo de incubación a la mezcla de DNA (templado/buffer/primer) se le adicionó 1 μ l de

DTT 0.1M, 2 μ l de la dilución del labeling mix, 0.5 μ l de radiactividad dATP³² (Amersham LIFE SCIENCE), y 2 μ l de la enzima T7 SEQUENASE. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez que terminó dicho tiempo se le colocó 4.5 μ l de la mezcla a cada mezcla apropiada (G, A, T, C) y se dejó incubar a 37°C por 5 minutos. Para detener la reacción de la mezcla, se le agregó 4 μ l de solución de paro (stop). Antes de cargar las muestras en el gel de poliacrilamida (STRATAGENE) se calentaron 5 minutos a 72°C, enseguida se cargó 2.5 μ l de la mezcla por pozo. Las condiciones de corrimiento tanto para la corrida corta como la larga fueron aproximadamente de 1860 a 1960 volts (Voltaje-constante), sobre un buffer de Tris-boratos-EDTA (TBE: Tris Base 100mM, Ac Borico 100mM, EDTA 0.5M). Una vez que terminó el corrimiento, el gel se secó y se dejó exponer 24 horas sobre una película de rayos-X (Kodak). La secuencia y se analizó en la base de datos (GENBANK) para determinar la proteína homóloga o comparar la secuencia con otras ya descritas que codifican para QM, *Jif-1* o L10.

5.1.5.- MARCAJE DE LA SONDA (*EhL10*) .

El DNA (inserto) que se purificó por medio del Jet Sorb (GENOMED), se utilizó como sonda. Dicho DNA se marcó radiactivamente bajo el siguiente protocolo: se colocó en un tubo eppendorf 4 μ l de agua estéril, 6 μ l de DNA producto de PCR (*EhL10*), 3 μ l de dNTPs (dTTP, dGTP, dCTP), 2 μ l de buffer de hexámeros: como cebador, 5 μ l de radiactividad dATP³² (Amersham LIFE SCIENCES) y 1.5 μ l de enzima Klenow (Boehringer Mannheim). La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C. Una vez que termino dicho tiempo se le adicionó 200 μ l de buffer TE (Tris -HCL, EDTA).

5.1.6.- PURIFICACIÓN DE LA SONDA (*EhL10*).

Se preparó la columna en una jeringa de 1ml, dicha jeringa se tapó en su base con fibra de vidrio estéril, y se la adicionó 1ml de sephadex G50. La columna se colocó dentro de un tubo eppendorf sin tapa y a su vez dentro de un tubo cónico de 15ml, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos para empaquetar el sephadex G50. Después de la incubación de 1 hora de la sonda, esta se colocó dentro de la columna de sephadex G50 y se centrifugo a 3500 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de radiactividad y por lo tanto purificar la sonda. Así que la sonda se colectó en el tubo eppendorf que se colocó en la base del tubo cónico de 15 ml.

5.1.7.- ESCRUTINIO SOBRE UN BANCO DE cDNA DE λ ZAP II.

Para la técnica de hibridación de DNA, se utilizó el protocolo B (Catalogo #237211, 237511, 237611) recomendado por Stratagene.

Durante el primer día se dejó un cultivo de 5 ml de medio LB de la Bacteria XL1-BLUE, con 50 μ l de MgSO₄, 50 μ l de maltosa para estimular la formación de pilis en la bacteria, durante toda la noche en agitación a 37°C. Al segundo día se puso a interaccionar durante 15 minutos 600 μ l de bacteria (XL1-BLUE) con 50 μ l del fago λ zap II a una dilución de 10⁻² (5 μ l del stock del fago + 450 μ l de buffer SM), a dicha dilución los fagos formaron aproximadamente 50,000 placas líticas, además de que después de la interacción se adicionó 6.5 ml de top agar para formar el cespced de bacterias-fagos sobre cajas de medio NZY de 150mm de diametro, las cuales se dejarón incubar a 37°C toda la

noche. Al tercer día las cajas se pasaron a 4°C por 2 horas, enseguida se identificaron las placas líticas y se colocaron los filtros de nitrocelulosa (NC) sobre el césped durante 2 minutos para que se adhirieran los fagos, se colocó un segundo filtro por 4 minutos sobre el césped; dichos filtros se marcaron sobre el césped para su orientación. Enseguida los filtros se pasaron por: una solución desnaturalizante (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) por 2 minutos con el fin de separar las cadenas de DNA adherido a los filtros, por una solución neutralizante (1.5M NaCl, 0.5M TRIS-HCL pH 8.0) durante 5 minutos para neutralizar al NaOH y por una solución de lavado (0.2M TRIS-HCL pH 7.5. 2xSSC) por 30 segundos para eliminar el exceso de top agar adherido a los filtros. Una vez que se lavaron los filtros, se colocaron sobre papel whatman y se hornearon a 80°C durante 2 horas para fijar el DNA a la membrana de nitrocelulosa. Durante el tiempo de incubación se preparo 50ml de solución de pre- hibridación, la cual contenía 25ml de formamida desionizada, 15ml de SSC 20x, 2.5ml de SDS 20%, 5ml de solución Denhardt 50X, 2ml de agua bidestilada y 0.5ml de DNase el cual se pre- calentó a 100°C por 10 minutos y se dejó en hielo por 5 minutos (se adicionó al volumen deseado). Después los filtros se colocaron dentro de bolsas de plástico y se bloquearon con 25ml de la solución de pre- hibridación (la cual bloqueara los sitios donde no hay DNA adherido a los filtros), dichas bolsas se sellaron y se dejaron los filtros incubar en agitación durante toda la noche a 42°C. El resto de la solución de pre- hibridación se guardó a -80°C. Para la hibridación de la sonda con el DNA adherido a los filtros, a los 25 ml de solución de pre-hibridación se le adicionó los 200µl de DNA que se marcó radiactivamente y se purificó anteriormente, antes de adicionar la sonda esta se pre- calentó a 100°C durante 10 minutos y se colocó en hielo por 5 minutos, enseguida se sellaron de nuevo las bolsas y se dejaron incubar el fin de semana en Agitación a 42°C. Después del tiempo de hibridación los filtros se pasaron por: una solución de enjuague (SSC 20x, agua bidestilada) por 10 minutos, después en una solución de lavado (SDS 20%, SSC 20x, agua bidestilada) por 30 minutos, lo cual permitió eliminar el exceso de radiactividad a los filtros. La solución de hibridación se guardo a -80°C. Una vez enjuagados los filtros se colocaron sobre papel whatman, y se cubrieron con megapack, y se dejaron exponer con una película de Rayos -X (Kodak) a -80°C durante 4 días.

Se identificaron las colonias en la película y se purificaron a partir de las cajas con medio 2YT con el césped de top agar; las colonias se cortaron con la base de una pipeta pasteur estéril, el agar se colocó en 1ml de buffer de dilución del fago SM (NaCl, MgSO₄, Tris-HCl 1M pH 7.5 y Gelatina al 2%) al cual se le adicionó 100µl de cloroformo (esto permitió que los fagos salieran del agar hacia el buffer y a su vez lisar las bacterias presentes), y así purificar los fagos.

Se realizó un segundo escrutinio (protocolo B, Catalogo # 237211, 237511, 237611) en cajas chicas de medio NZY, para obtener aproximadamente 50 placas líticas a partir de los fagos que se purificaron durante el primer escrutinio. Para lo cual se siguió la misma Metodología antes descrita durante el 1° escrutinio.

5.1.8.- EXCISION *in vivo* DE pBLUESCRIPT.

A las clonas positivas que contenían el inserto, se les realizó la técnica de excisión *in vivo* a partir de λ zap II y se purificaron de acuerdo al procedimiento del protocolo USING THE ExASSIST/SORL SISTEM recomendado por Stratagene (protocolo B.catalogo # 200400).

Se colocó un cultivo de 20 ml de medio LB de la bacteria XL1-BLUE, con 200 μ l MgSO₄, y 200 μ l de maltosa durante toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente, del cultivo anterior se tomaron 200 μ l y se adicionaron a 20ml de medio LB, con 200 μ l de MgSO₄, 200 μ l de maltosa. Se incubaron en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzo una D.O (densidad óptica) de 0.5-1.0 a 600nm.

Para la excisión *in vivo* se tomarón 600 μ l de la bacteria fresca (XL1-BLUE con una D.O. de 0.5 - 1.0 a 600nm), 200 μ l del fago purificado en el segundo escrutinio y 1 μ l del fago helper (helper, ExASSIST, R408+) y se dejó incubar la mezcla a 37°C por 15 minutos. Después de los 15 minutos de interacción se le agregó 3 ml de medio 2YT incubándose en agitación a 37°C durante 3 horas. Una vez que terminó la incubación la mezcla se calentó a 72°C durante 20 minutos, lo que permitió eliminar a las bacterias. Después se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 3500 rpm para asentar los restos celulares (bacterias), permitiendo que el fago quedara en el sobrenadante (SN). Dicho sobrenadante se recuperó en un tubo cónico de 50 ml esterilizado. Posteriormente en un tubo eppendorf se colocaron 50 μ l de fagos (sobrenadante), 200 μ l de bacterias frescas (XL1-BLUE con una D.O. de 0.5-1.0 a 600nm) y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Después de la interacción, se espatularon 125 μ l de la mezcla en caja de LB/ampicilina (2 cajas), y se incubaron toda la noche a 42°C. Para observar las colonias del plásmido pbluescript, las cajas se dejaron a temperatura ambiente de 4 a 6 horas aproximadamente. Una vez que las colonias fueron visibles, se seleccionaron y se purificó plásmido usando el sistema de miniprep del kit CONCERT/GIBCO BRL. El plásmido purificado se corto con las enzimas de restricción Bam H1 y Xho 1 (Biolabs), con esto se determinó el tamaño del inserto del gene *EhL10*. Posteriormente se obtuvo DNA plásmidico de la colonia de interes a partir de un cultivo de 20 ml de medio LB con 40 μ l de ampicilina a una concentración de 25 μ g/ml, el cual se dejo incubar toda la noche a 37°C.

5.1.9.- SECUENCIACIÓN DEL GEN *EhL10*.

Para la secuenciación de nucleotidos del plásmido pBluescrip SK+ obtenido a partir de la técnica de excisión *in vivo* y que contiene el gen *EhL10* , se realizó de acuerdo al protocolo de secuenciación mediado por dideoxínucleotidos (Sanger y col., 1977). Para comprobar que la secuencia era la correcta se secuencio en un sistema automático ABIPRISM Model 310, Versión 3. La secuencia se analizó en una base de datos de datos (GENBANK) para deteminar la proteína homología con otros genes ya reportados.

5.2.- EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *EhL10*.

5.2.1.- CLONACIÓN DEL FRAGMENTO DE DNA EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pProEX HTc (GIBCO/BRL).

El gen *EhL10* que codifica para una proteína homóloga de aproximadamente 642 nucleótidos se obtuvo a partir del genoma de ameba y se clonó en el sitio Bam H1/Xho 1 del vector pProEX HTc. El protocolo que se siguió para realizar la clonación fue: el vector pProEX HTc se digirió con las enzimas de restricción Bam H1 y con Xho 1 (BIOLABS), con la finalidad de generar extremos cohesivos en el vector para impedir que se religara. Por otro lado el DNA (inserto) a clonar se liberó del plásmido pbluescrip mediante la digestión con las mismas enzimas, posteriormente tanto el vector como el inserto se corrieron en un gel de agarosa 1% y se purificaron por medio del kit de extracción de geles Jet Sorb (GENOMED) chequeándose la concentración de ambos para la reacción de ligación. La reacción de ligación la cual se realizó empleando la enzima T4 DNA ligasa y el buffer para la T4 ligasa (GIBCO/BRL). Dicha reacción se incubó 24 hrs a 16°C.

5.2.2.- TRANSFORMACIÓN DEL VECTOR pProEX HTc EN CÉLULAS DE LA CEPA *E. Coli* DH5 α .

Se realizó la transformación de células competentes DH5 α de *Escherichia Coli* bajo el siguiente protocolo: dentro de un tubo de vidrio esterilizado se mezclaron 200 μ l de células competentes con 20 μ l de la reacción de ligación, se dejó incubar 30 minutos a 4°C y 2 minutos a 42°C respectivamente y posteriormente se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó 60 minutos a 37°C en agitación. Después de la incubación la mezcla se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm para empastillar las células, dichas células se resuspendieron en medio LB y se espatularon en cajas de medio LB/Ampicilina incubándose 24 hrs a 37°C.

5.3.3.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE *EhL10*.

Para la Expresión de la proteína recombinante la cepa de la bacteria *E. coli* DH5 α que contiene el gene de *EhL10* se cultivó en medio LB en presencia de Ampicilina a una concentración de 25 μ g/ml. El cual se dejó en agitación durante 24 hrs a 37°C.

Al siguiente día se hizo una dilución 1:100 del cultivo crecido toda la noche y se dejó incubar de 2 a 3 horas a 37°C hasta alcanzó una densidad óptica (D.O) 0.5 – 1.0 a 600nm, una vez que alcanzo la densidad se le adicionó IPTG 100mM o al 2.3% ([] final de 0.4-0.6 mM) y se dejó inducir en agitación a 37°C durante 6 horas. Posterior al tiempo de inducción el cultivo se centrifugó 30 minutos a 6000 rpm a 4°C, y se decanto el sobrenadante, y la pastilla se guardó a -80°C. Para el tercer día, la pastilla se resuspendió en buffer de sonicado pH 8.0 (20mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl), la suspensión celular se sonicó (amplitud 9-10 watts durante 1 minuto con intervalos de 10 segundos) en un sonicador ULTRASONIC PROCESSOR/ULTRACEL. Posterior a la lisis celular, el lisado se centrifugó durante 15 minutos a 10,000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se dejó en hielo. Antes de la interacción del sobrenadante con las perlas Talón (TALON Metal Affinity Resin. Clontech, Cat. #8901-1), estas se lavaron 5 veces con 50 ml buffer de sonicado (entre cada lavado se centrifugó 2 minutos a 2000 rpm). Una vez que se

lavaron las perlas se pusieron a interaccionar con el sobrenadante durante toda la noche en rotación a 4°C. Al siguiente día, la interacción se centrifugó durante 2 minutos a 2000 rpm, las perlas se lavaron 5 veces con 50 ml de buffer de lavado (20mM Tris, 100mM NaCl y 10mM Imidazol). Posterior a los lavados las perlas se transfirieron a un tubo eppendorf y se le adiciono un volumen de buffer de muestra 2x para proteínas (Tris 1.0 M pH 6.8, SDS 10%, 2- β Mercaptoetanol, Glicerol), se incubaron a 100°C durante 5 minutos y después se centrifugo a 5000 rpm durante 15 minutos. Se recupero el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y se le adiciono azul de bromofenol. Para determinar el grado de pureza de la proteína se cargaron 50µl en un gel SDS/PAGE al 13% (Maizel, 1971).

Cabe mencionar que el patrón electroforético para proteínas en una-dimensión y en doble-dimensión, se observo tiñiendo el gel en una solución de azul de coomasie R-250 al 0.2%, ác. Acético al 7%, Etanol al 30% y destiñendolo en una solución de Ác. Acético 7%, Etanol 30%.

5.2.4.-PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE *EhL10* E INMUNIZACIÓN.

Previo a la inmunización, una vez que se purificó la proteína recombinante se obtuvo una cantidad suficiente de proteína a partir del corrimiento de varios geles SDS-PAGE al 13% (Maizel, 1971). Dichos geles se tiñieron y destiñieron como se mencionó anteriormente hasta visualizar la banda correspondiente a la proteína recombinante en referencia al marcador de peso molecular (GIBCO/BRL). Después de desteñir los geles de poliacrilamida se cortaron las bandas de la proteína y se colocaron en un tubo falcón estéril con solución PBS pH 7.4 (NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) durante 2 días para eliminar el exceso de ác. Acético (con 4 cambios de solución). Se guardaron a 4°C hasta que se usaron.

Para la producción de anticuerpos policlonales, se usaron 6 ratones hembras de la cepa Balb/C, las cuales fueron inmunizadas en 4 ocasiones con 50 µg de proteína. Previo a las inmunizaciones intraperitoneales se obtuvo a partir de los ratones el suero pre-inmune el cual se almacenó a -20°C. Para la primera inmunización la proteína se rompio (acrilamida) con una solución PBS pH 7.4 (NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) y se mezclo con un volumen de adyuvante incompleto de Freud's (GIBCO BRL), dicho adyuvante permite encapsular el antígeno (proteína) y montar una mejor respuesta inmune por parte del ratón. El resto de las inmunizaciones se realizaron cada 15 días alternando la aplicación del adyuvante con la proteína y la proteína sin adyuvante para inmunizar. Posterior a las inmunizaciones se obtuvo la sangre de los ratones y se dejó coagular a temperatura ambiente, después se centrifugo a temperatura ambiente durante 1 hora a 14,000 rpm y el suero se colectó en un tubo eppendorf estéril. El suero se guardó a -20°C.

5.2.5.- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES *anti-EhL10*.

Para la purificación del anticuerpo anti *EhL10* se utilizó el protocolo para la proteína G sepharosa, recomendado por Pharmacia Biotech, para lo cual se realizo lo siguiente: dentro de una pipeta pasteur estéril se coloco en la punta peló de ángel estéril y se empacó la sepharosa G (aproximadamente 1ml de sepharosa). La columna se lavo 2 veces con 3 ml de Buffer de Unión (Fosfato de Sodio 20mM, pH 7.0), al mismo tiempo el suero se diluyó 2 veces con Buffer de Unión (Fosfato de Sodio 20mM, pH 7.0) y se paso por la

columna de sepharosa. La columna se lavo una vez con 5ml de buffer de unión (Fosfato de Sodio 20mM, pH 7.0). El anticuerpo *anti-EhL10* se eluyo con 2 ml de Buffer de Elución (Glicina 0.1M, pH 2.7), una vez que se recupero el anticuerpo, inmediatamente se le adicionó 200µl de Tris 1M PH 9.0 con el fin de neutralizar el pH ácido (pH 2.7) del Buffer de Elución (se adicionó 100µl/ml de Buffer de Elución). El anticuerpo se almacenó a -20°C en alicuotas de 50 µl en tubos eppendorf.

5.2.6.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT) DE LA PROTEÍNA *EhL10*.

Después de la electroforesis de la proteína recombinante *EhL10* en geles SDS/PAGE al 13%, estas fueron electroforéticamente transferidas a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium: # cat. 162-0115 BIO-RAD) usando el sistema de Trans-blot Cell de Bio-Rad (USA) en Buffer Tris, Glicina y Metanol 10%, durante 150 minutos a 90 volts. Posteriormente la membrana se bloqueo con leche al 5%, incubandola toda la noche con solución amortiguadora de Fosfatos-Tween (Na_2HPO_4 1M, NaH_2PO_4 1M, NaCl 5M, Tween 20 al 0.005%), al día siguiente se coloco el primer anticuerpo (α -*EhL10*) a una dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Después se incubo un segundo anticuerpo *anti-IgG* de ratón acoplado a peroxidasa (HRPO- American Qualex) a una dilución 1:5000 durante 4 horas a 37°C. La reacción se detecto empleando el sistema de peroxidasa, en el cual se mezclo 2ml de 4-cloro-naftol 6x (0.15g en 50 ml de Metanol) con 10ml de solución (Na_2HPO_4 1M, NaH_2PO_4 1M) y 4µl de H_2O_2 (Merk), en dicha mezcla se enjuago la membrana hasta visualizar la banda correspondiente a la proteína esperada, reconocida por el anticuerpo *EhL10*.

5.3.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE *E. histolytica*.

Para la obtención de proteínas ribosomales de amiba *Entamoeba histolytica* se siguió el método descrito por Warner, 1971.

Para lo cual 7×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon en un tubo cónico de 50 ml, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, en donde se tiro todo el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 0.625 ml de inhibidor de proteasas p-Hidroximercuribenzoato (SIGMA) a una concentración de 2.5 mM y las células se rompieron por congelación/descongelación (hielo seco/acetona) durante 2 tiempos. A la pastilla se le agregó 25 ml de solución LHB (NaCl 100mM, MgCl_2 30mM, TRIS-HCL pH 7.4 10mM) para lo cual a un 1g o 2g de células se les adicono 15 ml de solución LHB (Zinker, 1980), se congeló/descongeló (hielo seco/acetona) dos veces.

El paquete celular se rompió con un homogeinizador de vidrio tipo Dounce a 4°C, dándole aproximadamente 90 golpes, hasta observar en microscopio que las células quedaran completamente rotas. El lisado celular se colocó en un vaso de precipitado, en agitación a 4°C, y se le adicionó 1.250 ml de una solución al 0.5% de DOC (Desoxicolato de Sodio al 10% ; 0.05 ml de DOC 10% en 1 ml de LHB) en LHB, se mezcló y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Enseguida se le agregó 1.250ml de una solución de BRIJ-58 al 0.5% (0.05ml BRIJ-58 al 10% en 1ml de LHB) en LHB, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 5 minutos.

Después de la incubación en hielo, la mezcla se centrifugo a 4°C a una velocidad de 10,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó en un vaso de precipitado y se dejó en hielo. Enseguida en tubos para rotor 60 ti con tapa se colocó 5 ml de sacarosa al 15%, 5% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en Solución LHB, se adicionó el sobrenadante (formando dos fases), esta solución se centrifugó a una temperatura de 4°C por 4 horas a 45,000 rpm. Posterior a la centrifugación, para la obtención de proteína total ribosomal, se realizó mediante el método desarrollado por Hardy y col. (1969) en donde la pastilla que se obtuvo se lavo dos veces por rotación con una cantidad suficiente de buffer 10^{-5} (NaCl_2 100mM, HEPES 10mM, MgCl_2 10-5M), enseguida se le adicionó 2 ml de buffer 10^{-5} . La pastilla se resuspendió en agitación sobre hielo durante 30 minutos, después se le agregó simultáneamente 2 volúmenes de ácido acético glacial (4ml), 0.1 volumen de MgCl_2 1M (200 μ l), se dejó agitar a 4°C durante 30 minutos. Posterior a esto la mezcla se colocó dentro de una bolsa de diálisis, en donde se dializó durante 24 horas contra una solución de ácido acético 0.5 M para lo cual se le hicieron cambios de la solución de ácido acético 0.5M cada 8 horas. La muestra se liofilizó y se corrió el patrón electroforético en geles de poliacrilamida uni y bidimensional.

5.4.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El sistema de geles bidimensionales que se usó para el análisis de proteínas ribosomales de amiba y levadura fue el descrito por Mets y Bogarad en 1974, en el que la 1° dimensión fue en urea a pH 5.0 y para la electroforesis en la 2° dimensión fue en presencia de SDS, desarrollado por Maizel en 1971.

5.4.1.- 1° DIMENSIÓN EN GEL CILINDRICO A pH 5.0 EN TUBO DE 0.5mm x 14cm. (Mets y Bogarad, 1974).

En el primer día, los geles cilíndricos de poliacrilamida (Acrilamida 4%, Methylenebisacrilamida 0.1%, Urea 8M, Bis-Tris 0.057M pH 5.0) se prepararon en tubos de vidrio de 0.5 mm x 14 cm, los cuales se sellaron en la base con parafilm. Para polimerizar 10 ml de la solución de poliacrilamida (Acrilamida 4%, Methylenebisacrilamida 0.1%, Urea 8M, Bis-Tris 0.057M pH 5.0) se colocó 30 μ l de solución APS 10% (persulfato de amonio) y 10 μ l de TEMED, esta solución se vació dentro del tubo con la ayuda de una pipeta pasteur estéril y al mismo tiempo se estratifico la superficie del gel con agua bidestilada estéril, y por consiguiente se dejaron polimerizar a temperatura ambiente.

Una vez que polimerizó la acrilamida, los tubos se colocaron en la cámara de electroforesis en la cual se colocó Buffer Bis-tris 10mM pH 5.0 en el reservorio superior y buffer Acetato de Potasio 0.179 M en el reservorio inferior. Para el corrimiento de la muestra (proteína) se peso 8 y 12 mg de proteína liofilizada, la cual se disolvió en 100 y 300 μ l de buffer para proteínas (Urea 8M, Glicerol 10%, Ácido Acético 0.1%, 2- β -Mercaptoetanol 10%, Fuschina Básica).

La proteína se dejó reposar a temperatura ambiente durante 4 horas, terminado el tiempo de reposo, antes de cargar la muestra de proteína en el gel cilíndrico, este se lavó con buffer Bis-Tris 10mM y la muestra se centrifugó durante un pulso de 30 segundos, inmediatamente la muestra se cargo sobre el gel y se formo dos fases con buffer Bis-Tris

10mM pH 5.0 del reservorio superior. La electroforésis se realizó con los polos invertidos (de +/-) y se dejó correr a 50 volts durante toda la noche.

5.4.2.- EQUILIBRIO DEL GEL CILÍNDRICO PARA LA 2° DIMENSIÓN.

Los geles cilíndricos se sacaron del tubo con la ayuda de una jeringa Hamilton de 1 ml, la cual se llenó de solución de equilibrio (Urea 4 M, Tris Base 0.5 M, SDS 1%, pH 6.8). La aguja de la jeringa se metió entre el gel y la pared interna del tubo lo que permitió que se desplazara el gel sobre la pared del tubo. Posteriormente se dejó incubar el gel a temperatura ambiente en la solución aproximadamente 5 horas. Este procedimiento permitió el aumento del pH por parte del gel cilíndrico de la 1° dimensión hasta un valor similar al del gel concentrador de la 2° dimensión (pH 6.8) y por lo tanto permitir la introducción, por difusión del SDS a las proteínas ribosomales (Mets y Bogarad, 1974; Gorenstein y Warner, 1976).

5.4.3.- 2° DIMENSIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA - SDS AL 13% (Maizel, 1971).

Para la segunda dimensión los geles en placa se prepararon igual al del 10% de acrilamida, solo que con separadores con un grosor de 3 mm y sobre vidrios biselados. Para el gel resolutivo se mezcló en un matraz erlenmeyer de 125 ml: 26 ml de acrilamida al 30%, 22.5 ml de Tris pH 8.8, 0.6 ml de SDS al 10%, 10.5 ml de agua, 240 µl de APS al 10% (persulfato de amonio) y 50 µl de TEMED. Una vez que polimerizo el gel separador, se colocó el gel concentrador al 4% en el que se mezcló en un matraz de 125 ml: 3.99 ml de acrilamida al 30%, 3.75 ml de Tris pH 6.8, 0.3 ml de SDS al 10%, 28.8 ml de agua, 300 µl de APS al 10% y 15 µl de TEMED. Ya que polimerizo el gel concentrador, sobre de el se colocó el gel cilíndrico y al mismo tiempo se preparo el marcador de peso molecular para proteínas en un bloque de agarosa. Posteriormente se sello con agarosa al 1% preparada en buffer para proteínas (Glicina 0.192 M (14.4gr), 25 mM Tris (3.0gr), SDS 10%), evitando que quedaran burbujas atrapadas entre el gel cilíndrico y el gel concentrador. Posterior a esto se monto la cámara de electroforesis y tanto en el reservorio superior como en el inferior se colocó buffer para proteínas (Glicina 0.192 M (14.4gr), 25 mM Tris (3.0gr), SDS 10%). La corrida se llevó a cabo a 47 volts durante toda la noche, hasta que el frente de corrida llego al fondo del gel. La tinción del patrón electroforético de las proteínas ribosomales se realizó como se mencionó anteriormente.

5.4.4.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT) DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES DE AMIBA.

Después de la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas ribosomales de *Entamoeba histolytica* y *Saccharomyces cerevisiae* en geles SDS/PAGE al 13%, las proteínas fueron electroforéticamente transferidas a membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium: # cat. 162-0115 BIO-RAD) usando el sistema de Trans-blot Cell de Bio-Rad (USA) en Buffer Tris, Glicina y Metanol 10%, durante 4 horas a 0.5 Amperes. Posteriormente la membrana se bloqueo con leche al 5%. Para la incubación tanto del primer anticuerpo (α -EhL10) como del segundo anticuerpo *anti-IgG* de ratón acoplado a peroxidasa (HRPO- American Qualex) se realizó como se menciona anteriormente en el ensayo de Western blot. De igual manera se realizo para el reconocimiento de QM en proteínas ribosomales tanto de *Entamoeba histolytica* como *Saccharomyces cerevisiae* con

el anticuerpo *anti-QM* de humano, el cual se uso a una dilución de 1:1000 y el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa *anti-IgG* de conejo, se uso a una dilución de 1:5000.

RESULTADOS.

6 Amplificación del inserto *EhL10* a partir de cDNA λ zap II.

De la técnica de PCR realizada sobre el banco de cDNA de λ Zap II se obtuvo un inserto amplificado de aproximadamente 400 pb (Figura 1,... Carril 4) a partir de 4 clonas seleccionadas al azar. La reacción de PCR para amplificar el inserto por medio del oligo T7 y el oligo degenerado A12 (act/a ggt/a atg aga/t gga gct/a tgg) fue bajo las siguientes condiciones: temperatura de 94°C durante 2 minutos, una temperatura de alineamiento de los oligos de 49°C durante 30 segundos y una temperatura de extensión de la taq polimerasa de 72°C por 1 minuto, además de una temperatura adicional de 72°C por 7 minutos. Dicho inserto de 400 pb se purificó y sé clonó dentro del vector PCR 2.1, el cual se transformó en DH5 α . A las colonia blancas se les realizo una PCR colonia para corroborar que estuviera el inserto presente (Fig. 2), de dicha PCR solo una colonia fue positiva con el inserto de aproximadamente 400pb. La colonia se purificó para obtener el DNA plásmido (Fig. 3) y posteriormente secuenciarlo.

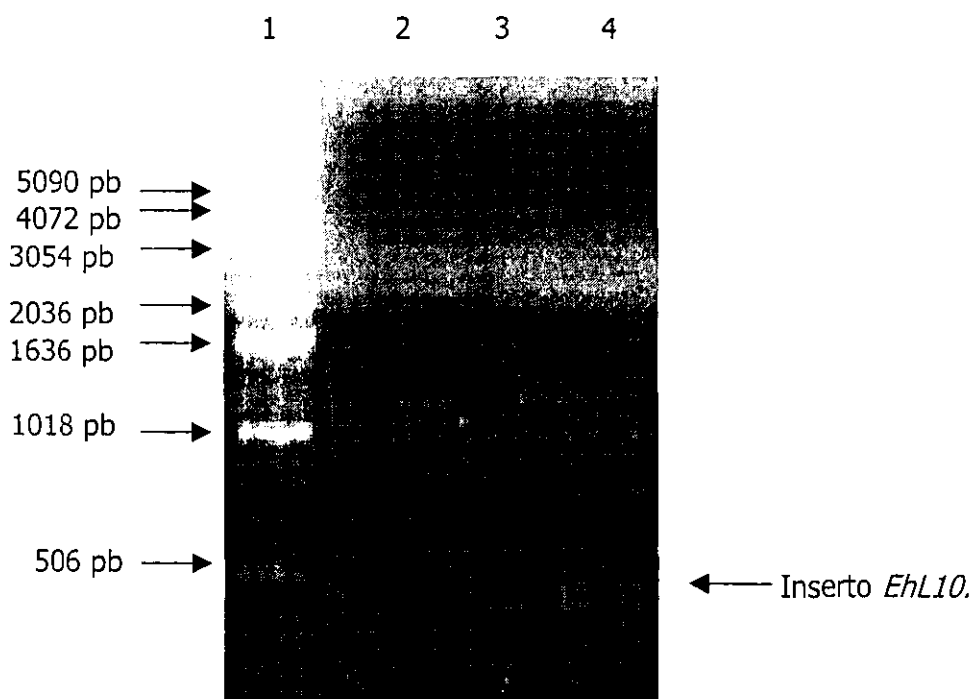


Fig. 1. PCR realizada con el oligo degenerado A12 y T7, sobre cDNA λ ZAP II de *E. histolytica*. Carril 1. MPM; Carril 2. Clona 1 ., Carril 3. Clona 2 ., Carril 4. Clona 3 con Inserto amplificado de aproximadamente 400 pb que corresponde al gene *EhL10* indicado con una flecha. Gel de Agarosa al 1%.

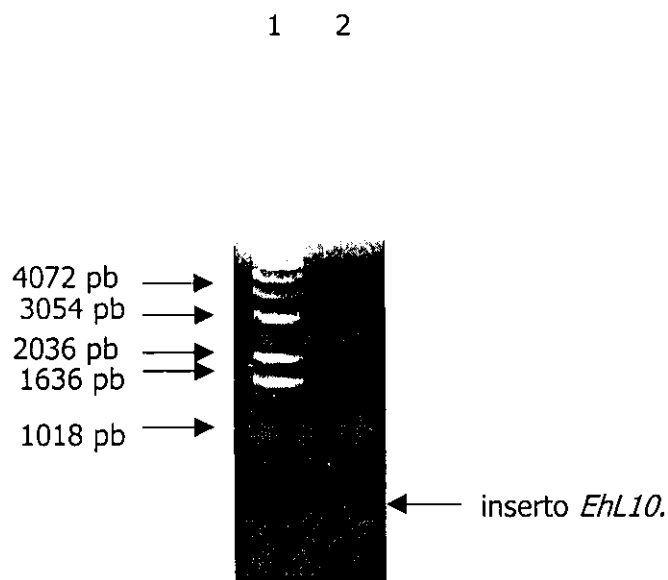


Fig. 2. Ensayo de PCR sobre colonia analizada sobre un gel de agarosa al 1%. Carril 1. MPM., Carril 2. Inserto de 400 pb amplificado con los oligos T7 y M13 reverse.

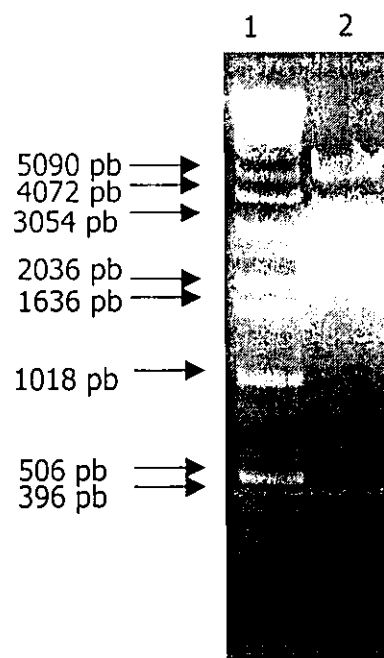


Fig. 3. DNA plásmidico pCR2.1 Purificado, contiene el inserto de 400 pb del gene *EhL10*. Carril 1. MPM., Carril 2. pCR 2.1 - *EhL10*. Gel de Agarosa al 1 %.

Secuenciación del inserto *EhL10*.

El plásmido que contiene el inserto *EhL10* se secuenció automáticamente por medio del Sistema ABIPRIMS Model 310, Versión 3 (Fig. 4). La secuencia obtenida se analizó por medio del uso del programa de computo llamado BLASTX, para determinar la homología con otras proteínas en una base de datos. El resultado de este análisis reveló que nuestra secuencia está relacionada con la proteína ribosomal L10 de la subunidad 60s de *Oryza sativa* (Fig. 5) con un 48% de identidad (homología), dicha proteína presenta una actividad de proteína supresora del gene SG12. También presenta una fuerte homología con la proteína *jif-1* de pollo (Monteclaro y Vogt, 1993) con un 41% de identidad, con la proteína QM de humano (Dowdy y col., 1991) con un 45% de identidad, con el cDNA de *Arabidopsis thaliana* el cual codifica para un homólogo al supresor tumoral de Wilm's (Rivera-Madrid y col., 1993) con un 43% de identidad y con la proteína L10 de rata, homologa a la proteína QM (Chang y col., 1996) con un 45% de identidad.

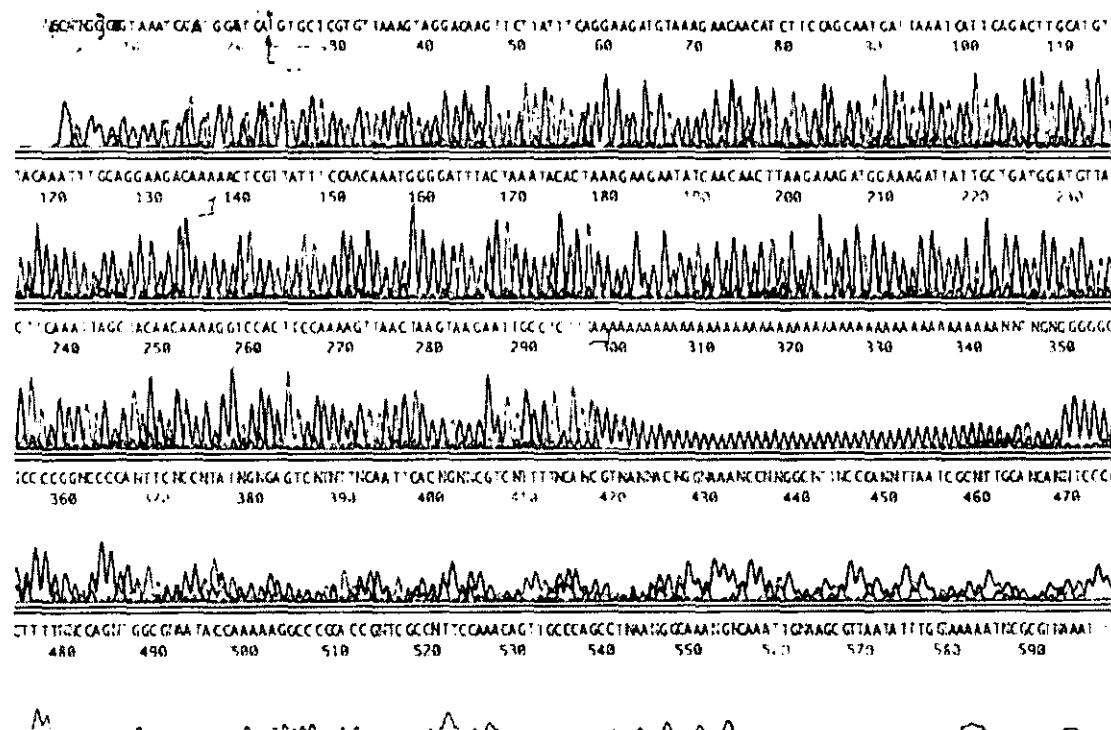


Fig. 4. Secuenciación en pares de bases del inserto *EhL10*.

Database Name SWISSPROT

>query

```
tgtgcctcgtg ttaaaatagg acaagttttt attltaggaa gntgttaaga
acaacatctt ccagcaatga ttaaatcatt cagacttcca tgttacaat
trgaggaag acaaaaactc gttatttcca acaaatgggg atttactaaa
cacactaaaq aagatataca ncaacttaag aaagatggaa agattattgc
tgatggatgt tacttcaaat tagctacacc aaeaggtccc ctcccaaaag
ttaactaagt aagaattgcc tctttaa
```

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Sum Probability P(N)	N
sp:R1C2 ORYSA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10-2 (PUTATIVE TU...	-1	202	1.2e-21	1
sp:R1C3 ORYSA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10-3 (QM/R22).	+1	202	1.3e-21	1
sp:RL10 SOLME 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (FOX).	-1	202	1.3e-21	1
sp:RL10 ARACH 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (WILM'S TUMOR ...	+1	202	1.3e-21	1
sp:RL10 MAIZE 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	198	4.8e-21	1
sp:R1Q1 ORYSA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10-1 (PUTATIVE TU...	+1	198	5.0e-21	1
sp:RL10 PINCA 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (WILM'S TUMOR ...	+1	198	5.3e-21	1
sp:RL10 TORAC 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	185	7.4e-21	1
sp:RL10 DROME 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	195	1.3e-20	1
sp:RL10 SCHPO 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	195	1.5e-20	1
sp:RL10 HUMAN 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN) (...	+1	193	2.3e-20	1
sp:RL10 FIG 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	192	3.2e-20	1
sp:RL10 RAT 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	192	3.2e-20	1
sp:RL10 CAHEL 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (QM PROTEIN HO...	+1	189	8.9e-20	1
sp:RL10 CHICK 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (NON-BINDING P...	+1	181	1.2e-18	1
sp:RL10 EUGGR 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10.	+1	176	6.6e-18	1
sp:RL10 YEAST 60S RIBOSOMAL PROTEIN L10 (L9; (UBIQUINO...	+1	174	1.3e-17	1
sp:GLI2 CHICK GALLINACIN 1 ALPHA.	-3	34	0.86	2
sp:TS11 GIALA MAJOR SURFACE TROPHOZOITE ANTIGEN 11 PRE...	+1	40	0.95	2
sp:HEA1 YEAST HEA1 PROTEIN.	+1	61	0.9992	2

Fig. 5. Homología del inserto de *EhL10* con otras proteínas de diversas especies a través del GENBANK, utilizando la base de datos BLASTX.

Aislamiento del cDNA que codifica para la proteína *EhL10*.

El cDNA que codifica para la proteína *EhL10* se aisló a partir de una librería de cDNA de λ ZAP II de *E. histolytica*, mediante un rastreo con el fragmento amplificado de DNA de aproximadamente 400 pb como sonda (Fig. 6). Durante el rastreo en la librería; 8 fagos recombinantes fueron positivos, de los cuales se purificaron a partir de una excisión *in vivo* y se analizaron por una restricción con las enzimas BamH1 y Xho 1 (Biolabs) para determinar el tamaño del inserto liberado, en dicha restricción solo una clona fue positiva con un inserto de 652 pb (Fig. 7). Esta clona se le denominó *EhL10*. El plásmido pBluescrip que contiene el inserto *EhL10* se purificó (Fig. 8).



Fig. 6. Primer y Segundo escrutinio sobre librería de cDNA de λ Zap II de *E. Histolytica*. Clonas obtenidas usando como sonda el inserto de 400 pb para rastrear fagos candidatos. Panel A. 1º escrutinio; Panel B. 2º escrutinio.

1 2

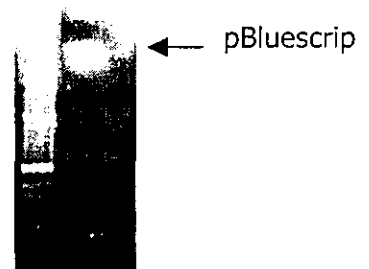


Fig. 8. Purificación del plásmido pBluescrip SK[+] que lleva el inserto de 652 pb correspondiente al gene *EhL10*. Carril 1. MPM; Carril 2. pBluescrip SK+. 5 μ l de DNA plásmidico en un gel de Agarosa al 1%.

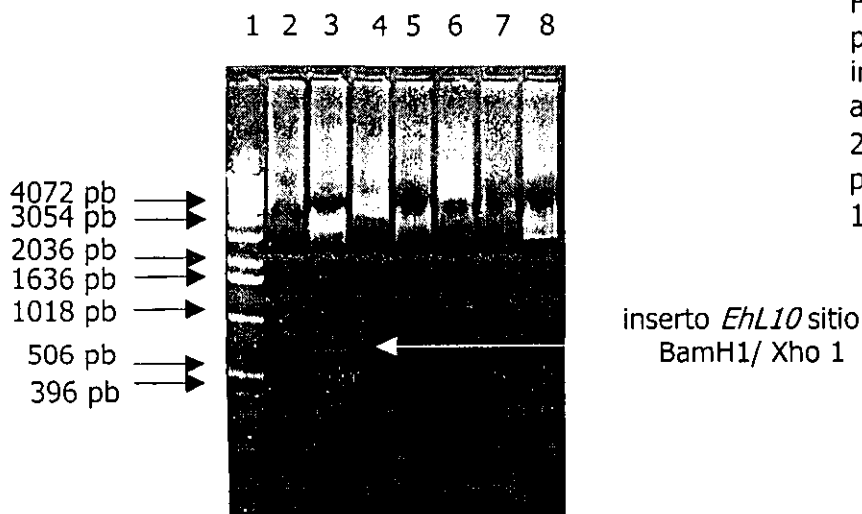


Fig. 7. Exsición in vivo de las clonas obtenidas a partir del 2º escrutinio del banco de cDNA de *E. Histolytica*. Carril 1. MPM; Carril 2. Clona 1 sin inserto; Carril 3. Clona con el inserto de 652 pb correspondiente al gene *EhL10*; Carril 4,5,7,8 Clonas sin inserto; Carril 6. Clona con inserto, no correspondiente al gene por tamaño. Gel de Agarosa al 1%.

Secuenciación del DNA y homología de la proteína *EhL10*.

Para conocer la secuencia completa del fragmento clonado en pBluescript se realizó una serie de secuenciaciones tanto manuales por medio el método de Sanger y col., 1977 y como por secuenciación automática por medio del Sistema ABIPRIMS Model 310, Version 3 (Fig. 9 y 10). De acuerdo al resultado obtenido a partir de ambas secuenciaciones, la secuencia completa en nucleótidos del fragmento de DNA clonado fue de 652 pb, esta secuencia se analizó por medio del programa de Blastx para determinar su homología con otras proteínas de diversas especies a partir de una base de datos (Fig. 11). La secuencia del DNA corresponde por homología al cDNA de la proteína ribosomal L10 de *Arabidopsis thaliana* con un 59% de identidad (homología), la cual es homóloga a un supresor tumoral de Wilm's (Rivera-Madrid y col., 1993). Además se observó que esta proteína esta relacionada con la proteína *jif-1* de pollo (Monteclaro y Vogt, 1993) la cual es una proteína de unión a *Jun* con un 55% de identidad; con la proteína QM de humano (Dowdy y col., 1991) con un 57% de identidad y con la proteína L10 de rata (Chang y col., 1996) con un 57% de identidad. La traducción de la proteína en tres posibles marcos de lectura abierto (ORFs) a partir de un programa de computadora revelo que la proteína presenta un marco de lectura abierto (ORF) de 217 aminoácidos (Fig. 12) con un codón (*taa*) de paro en el aminoácido 211. Así que el peso molecular calculado de esta proteína fue de 23.9 kDa. Así que la proteína *EhL10* presenta una fuerte homología con otras proteínas de diversos especies (Fig. 13), las cuales presentan un alto grado de conservación en regiones que están implicadas o que son necesarias para que estas se unan a *c-Jun* y por lo tanto al DNA, y poder ser denominadas como los primeros miembros de una clase de proteínas reguladoras de la transcripción altamente conservadas (Farmer y col., 1994).

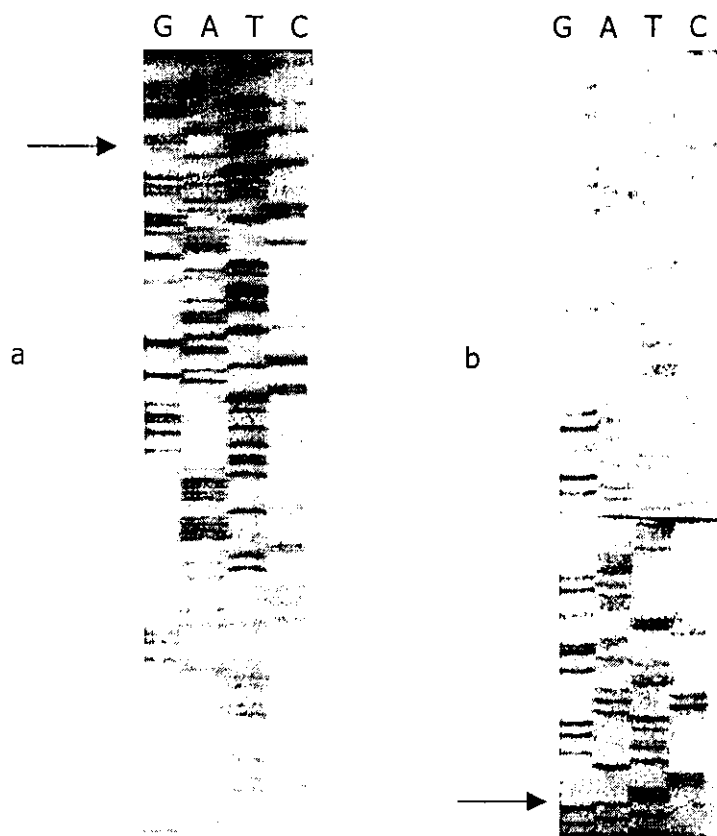


Fig. 9. Secuenciación del gene *EhL10* por el Método de Sanger. G-guanina, A-adenina, T-tiamina y C-citosina. Panel a: Corrida Corta. Panel b: corrida larga. Flecha del panel a: indica el inicio de la corrida corta, y la flecha del panel b: inicio de la corrida larga.

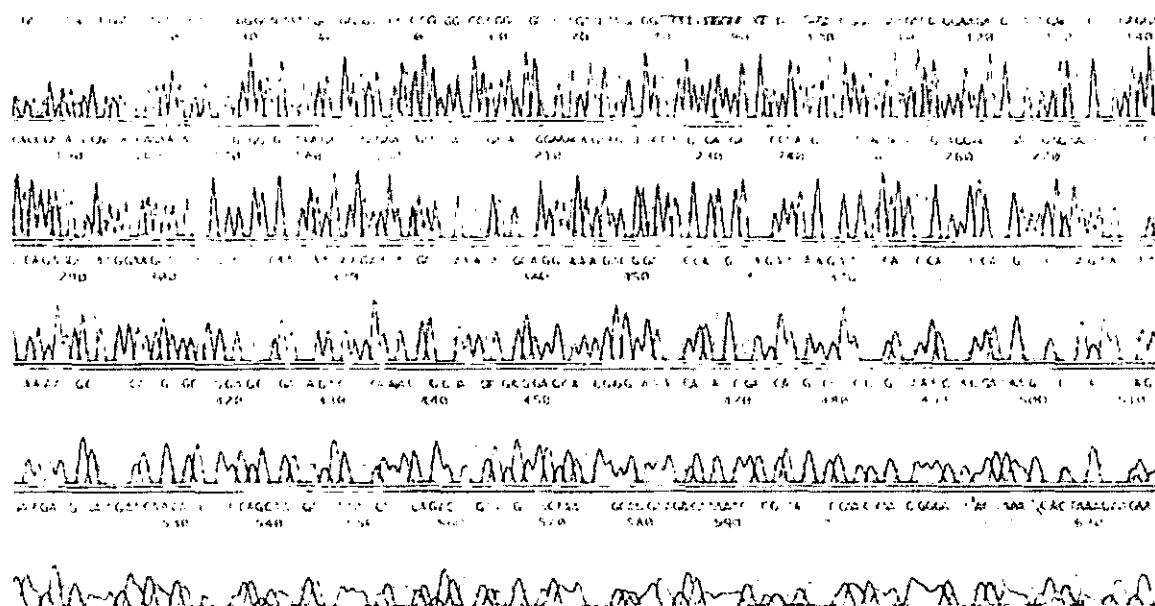


Fig. 10. Secuencia completa del gene *EhL10*.

```

NGRRPGRCYRLVRGHPYPKSKYCRGVDPRIKLEFDIGNRSAPCDDFPCCV 30
HIVGLERENISSAMEAARISINKNMLKYAGKDGPHVRIRIHPFHVLRIN 100
KMLSCAGADRLQTMRGANGKSYGSCARVKVGOVLI SGRCKEQHLPAMIK 150
SERLACYKFAGRQKLVISNKWGF TKYTKEEYQQLNKDGI IADGCYFKLA 200
TTKGPIPKVN*VRIASL

```

Fig. 11. Marco de Lectura Abierto de la Proteína *EhL10* a partir de la traducción en el GENBANK.

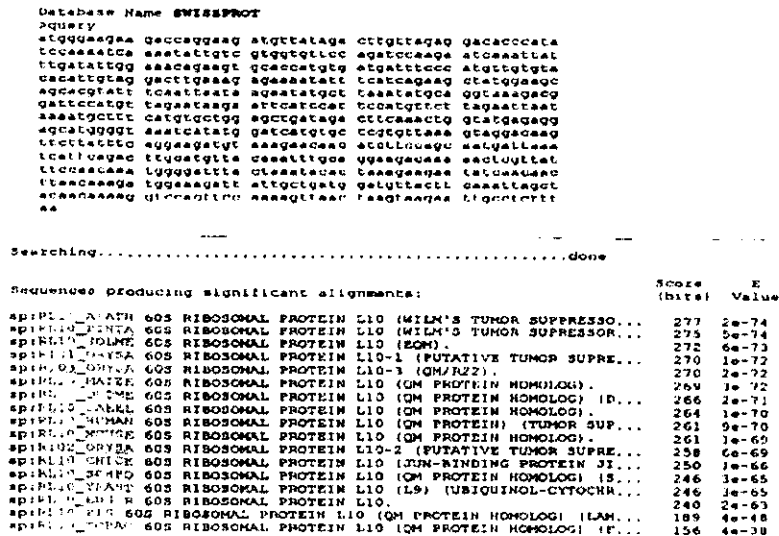


Fig. 12. Homología del gene completo de *EhL10* con otras proteínas en el GENE BANK.

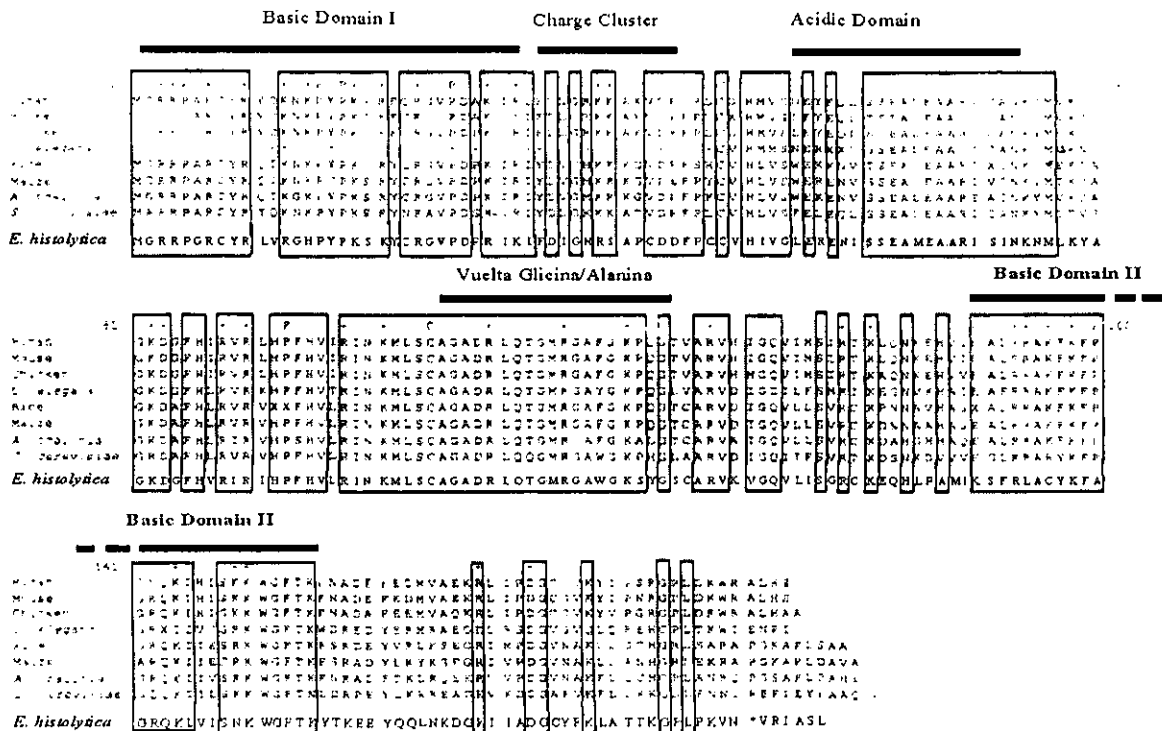


Fig. 13. Alineamiento multiple de secuencias relacionadas a *EhL10*, con otras especies. En la parte inferior, se muestra la secuencia obtenida para la proteína *EhL10* de *E. Histolytica*.

Expresión de la proteína híbrida *EhL10* en el vector pProEx HTc.

Para facilitar la expresión de la proteína *EhL10* en *E.coli* se utilizó el vector de expresión pProEx HTc (Gibco BRL), tomando en cuenta los sitios de restricción que pudieran afectar la clonación del inserto en el vector. Para lo cual el inserto que codifica para el gene *EhL10*, se libero (Fig. 14) de pBluescript SK+ mediante una restricción con las enzimas Bam H1 y Xho 1 (Biolabs), el inserto liberado de 652 pb fue clonado dentro del sitio Bam H1/Xho 1 del vector de expresión pProExHTc (Fig. 15 y 16) el cual nos permitió fusionar al extremo carboxi-terminal de la proteína recombinante un tag de 6x-histidinas (Clontech-Talon). Esta construcción del vector pProEx HTc con el inserto *EhL10* se transformó en la cepa *E. coli* DH5 α con el fin de poder expresar la proteína dentro de la cepa DH5 α . La expresión de la proteína recombinante de 23 kDa, se observó en un gel de acrilamida en el cual se corrieron electroforéticamente extractos totales de la cepa DH5 α que es portadora del vector pProEx HTc con el inserto *EhL10*, y que se sometió a condiciones de inducción con y sin Inductor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), una vez que se observó la expresión de la proteína recombinante se determino si esta se expresaba de manera soluble o insoluble mediante una lisis con y sin lisozima (10mg/ml) (Fig. B), la lisis se resuspendió en buffer de sonicado pH 8.0 (20mM Tris pH 8.0, 100mM NaCl), se centrifugó y se puso a interaccionar con la resina Talón. Para la purificación de la proteína recombinante, el tag de 6x-histidinas ubicado en el extremo carboxi-terminal de la proteína interactuó con la resina por medio de la afinidad a niquel (Ni ²⁺). La proteína unida a las perlas Talón se visualiza por electroforesis en geles desnaturizante de poliacrilamida. El péptido *EhL10* de *E. histolytica* de 23.9 kDa se purificó a partir del gel de poliacrilamida y se uso como antígeno para producir anticuerpos policlonales monoespecíficos en ratones.

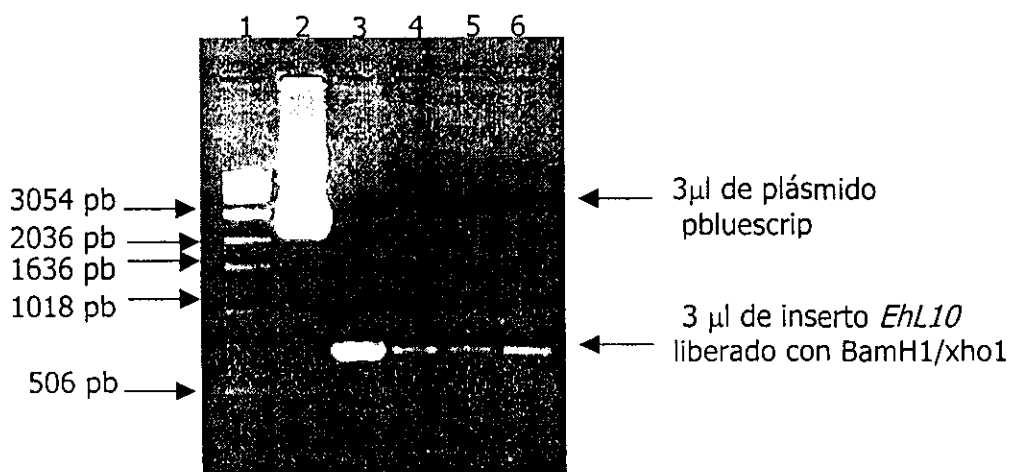


Fig. 14. Restricción del plásmido pBluescript SK+ con las enzimas BamH1/Xho1. Carril 1, MPM; Carril 2, Plásmido pBluescript no digerido; Carril 3,4,5 y 6; inserto *EhL10* a diferentes concentraciones, y liberado mediante una digestión. Gel de agarosa al 1%.

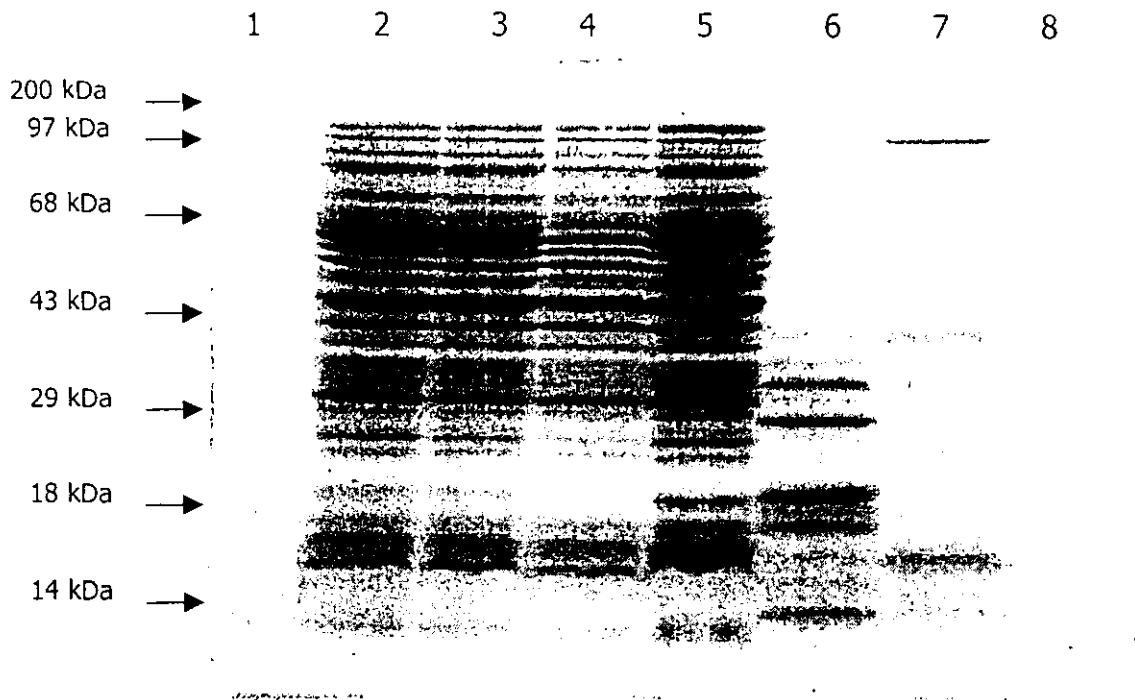


Figura B. Expresión y Purificación de la Proteína recombinante *EhL10*. Carril 1. MPM., Carril 2 y 3. proteínas totales de la cepa DH5 α con el vector pProex-HTc: sin inducir e inducida respectivamente., Carril 4 y 5, proteínas totales de la cepa DH5 α con el vector pProEx-HTc / *EhL10*: sin inducir e inducida., Carril 6. purificación de la proteína recombinante mediante el método soluble., Carril 7. purificación de la proteína recombinante mediante el método insoluble., Carril 8. Proteína *EhL10* electro-eluida y concentrada.

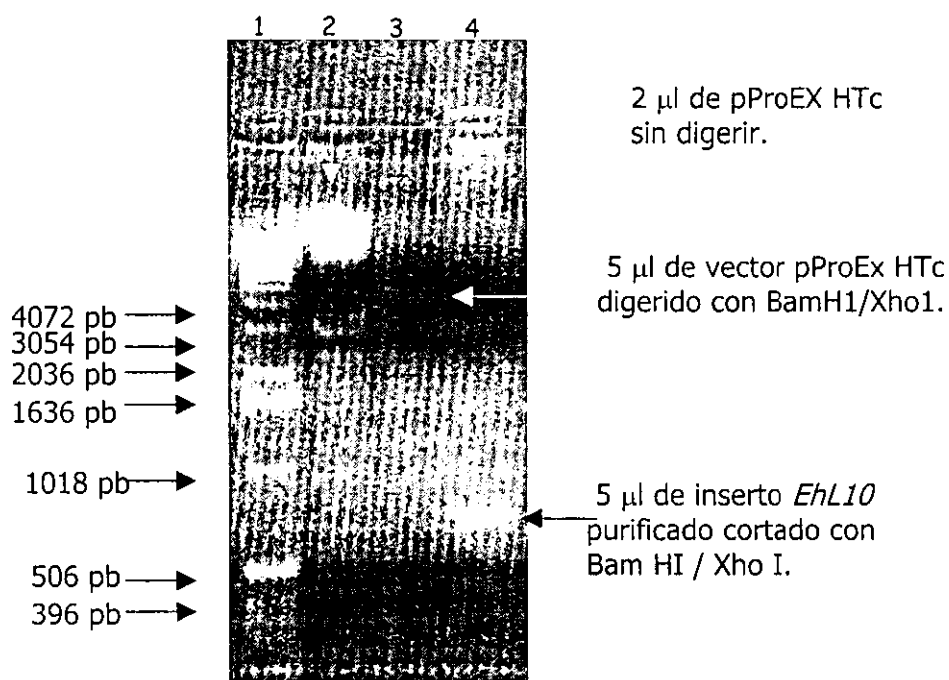


Fig. 15. Clonación del inserto *EhL10* en el vector de expresión pProEX HTc. Carril 1. MPM., Carril 2. 2 µl de pProEx no digerido., Carril 3. 5 µl pProEx digerido (BamHI/XhoI). Carril 4. 5 µl de inserto EhL10 Purificado (BamHI/XhoI). Agarosa al 1%.

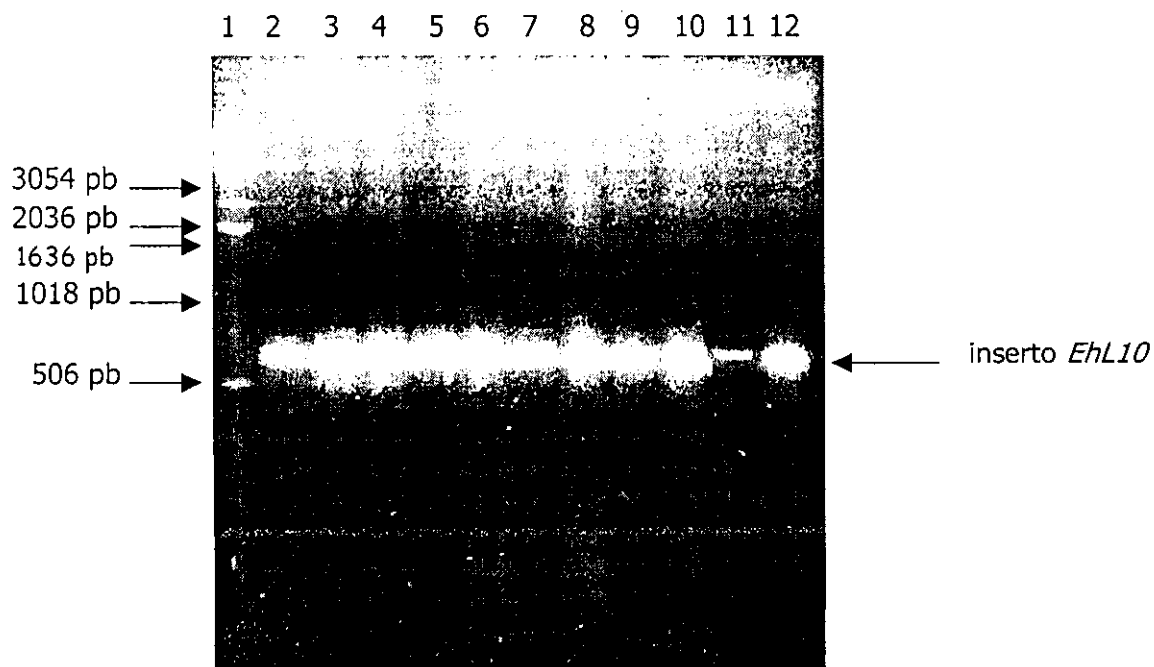


Fig. 16. PCR Colony con oligos específicos para EhL10. Ensayo de PCR sobre colonia analizada sobre un gel de Agarosa al 1%. Carril 1. MPM., Carril 2-12. Inserto de 652 pb amplificado con los oligos T7 y M13 reverse.

Aislamiento de proteínas ribosomales de *E. histolytica*.

Las proteínas ribosomales que se obtuvieron siguiendo el método descrito por Warner en 1971, se sometieron a electroforesis unidimensional (Maizel, 1971) y bidimensional (Mets y Bogorad, 1974) en geles de poliacrilamida. El patrón electroforético de las proteínas de amiba se observa en la Fig. 17, y de levadura en la Fig. 20. Este método de purificación permitió separar las proteínas ribosomales básicas a partir del ribosoma por medio de un colchón de sacarosa, por lo que se purificaron proteínas ribosomales tanto de la subunidad grande como de la subunidad pequeña del ribosoma. En el patrón electroforético de estas proteínas, se observa que hay proteínas de alto y bajo peso molecular; así como proteínas muy básicas y proteínas muy ácidas; la mayoría de las proteínas están dentro de un rango molecular de 29 kDa y 68 kDa. Durante el corrimiento electroforético en la primera dimensión de las proteínas ribosomales estas se separaron de acuerdo a su carga (+/-), lo que permitió separar a las proteínas grandes que tienen carga positiva neta (proteínas básicas) de las pequeñas que tienen una carga negativa neta (proteínas ácidas); por otro lado hay una gran cantidad de proteína que no entra al gel de la primera dimensión y se observa durante la segunda dimensión, esto podría deberse, a que la purificación de proteínas ribosomales es total a partir del ribosoma y no por subunidades, estas tal vez podrían estar asociándose entre si o con RNAr. Así que hay proteínas que se queda en el origen de la primera dimensión y durante la electroforesis de la segunda dimensión estas proteínas se quedan en la parte inicial del gel.

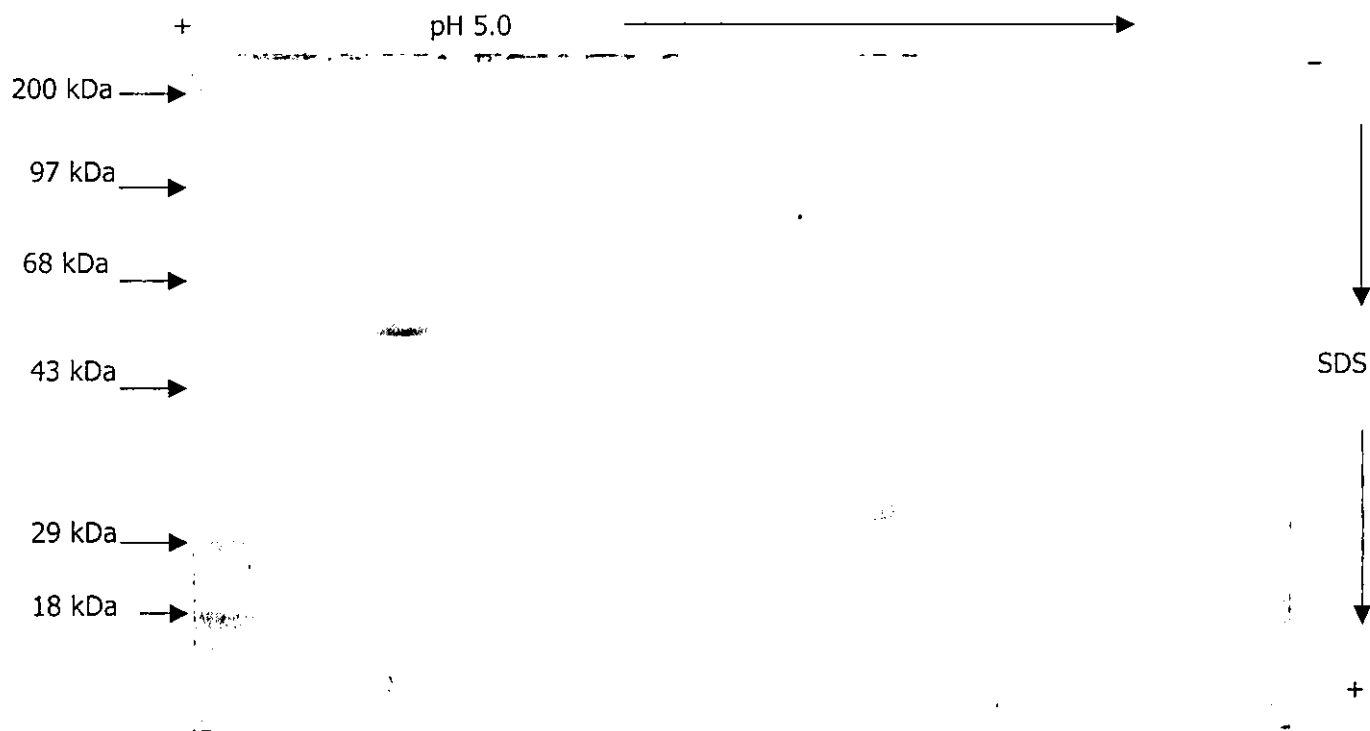


Fig. 17. Electroforesis bidimensional de proteínas ribosomales de *E. histolytica*. Mediante el Método de Mets y Bogorad, 1974.

Por otra parte el corrimiento electroforético tanto de proteínas ribosomales de amiba (Fig. 17) como de levadura (Fig. 20) en la segunda dimensión, se separaron de acuerdo a su peso molecular en el cual la mayoría de las proteínas básicas están dentro del rango molecular de 29 kDa y 68 kDa. Las proteínas ribosomales ácidas, en el corrimiento de la segunda dimensión no se observaron muy bien, debido a que por su carga neta (-) y por su composición de aminoácidos ácidos es difícil observarlas por coomasie, aún así se observaron pocas proteínas ribosomales ácidas en el patrón electroforético. Por otro lado se observó gran cantidad de proteína ribosomal de amiba en la segunda dimensión, la cual no entró al gel de la primera dimensión.

Inmunodetección de *EhL10* en proteínas ribosomales de *E. histolytica*.

Para purificar en homogeneidad la proteína *EhL10* , se aisló de geles de poliacrilamida y se inmunizó en ratones para la producción de anticuerpos *anti-EhL10*. Una vez que se obtuvieron los anticuerpos, se purificaron por columna de sepharosa y se utilizaron para detectar la proteína nativa de *L10* en el patrón electroforético de proteínas ribosomales de amiba mediante un ensayo de Western Blot (Fig. 18). La hibridación del anticuerpo *EhL10* sobre proteína total ribosomal de amiba, reveló una banda de aproximadamente 24 kDa lo que indica que es una proteína que cae en el peso molecular esperado en relación con el peso calculado de la proteína *EhL10* que es de 23.9 kDa. Esta diferencia podría estar dada a que, estas podrían ser proteínas homólogas pero son diferentes en cuanto a su estructura. Cabe mencionar que en el caso de la hibridación del anticuerpo *anti-QM* (Fig. 19, 21) sobre proteína ribosomal de amiba y levadura, reveló una banda de aproximadamente al mismo peso (24 kDa) a la detectada por el anticuerpo *anti-EhL10* . Estas bandas de aproximadamente 24 kDa están cerca del peso esperado que es de 23.9 kDa, esto nos hace pensar que estas proteínas podrían ser homólogas en estructura, en comparación con la detectada con el anticuerpo *anti-EhL10*. Así que, estas proteínas podrían ser similares en secuencia pero en cuanto a estructura ser diferentes, ya que podrían haber perdido algunos aminoácidos que estuvieran implicados en el arreglo estructural de la proteína.



Fig. 18. Western blot de proteínas ribosomales de *E. histolytica* separadas en geles bidimensionales y transferidas a membrana de nitrocelulosa, incubada con el anticuerpo α -*EhL10* dirigido contra la proteína L10 y revelada con un α -IgG acoplado a Peroxidasa como 2° anticuerpo.

Comparando los diferentes resultados, obtenidos a partir de los ensayos de Western blot mediante el uso de los anticuerpos α -*EhL10* y α -QM, revelaron que: en el caso de la proteína detectada a partir de proteína ribosomal total de amiba con el anticuerpo α -*EhL10*, reconoce una proteína básica de aproximadamente 24 kDa; mientras que para la proteína detectada en proteína ribosomal de amiba con el anticuerpo α -QM, reveló una banda de aproximadamente 24 kDa, pero corresponde a una proteína muy ácida, en comparación a la detectada en proteína ribosomal de levadura con el mismo anticuerpo. Esto podría interpretarse de la siguiente manera: que son proteínas diferentes las detectadas por el anticuerpo α -*EhL10* a las detectadas por el anticuerpo α -QM, en referencia al tipo de migración mientras una es básica (+) las otras dos son ácidas (-), sin embargo las proteínas parecieran tener un peso similar de aproximadamente 24 kDa, pero al parecer no son las mismas proteínas.

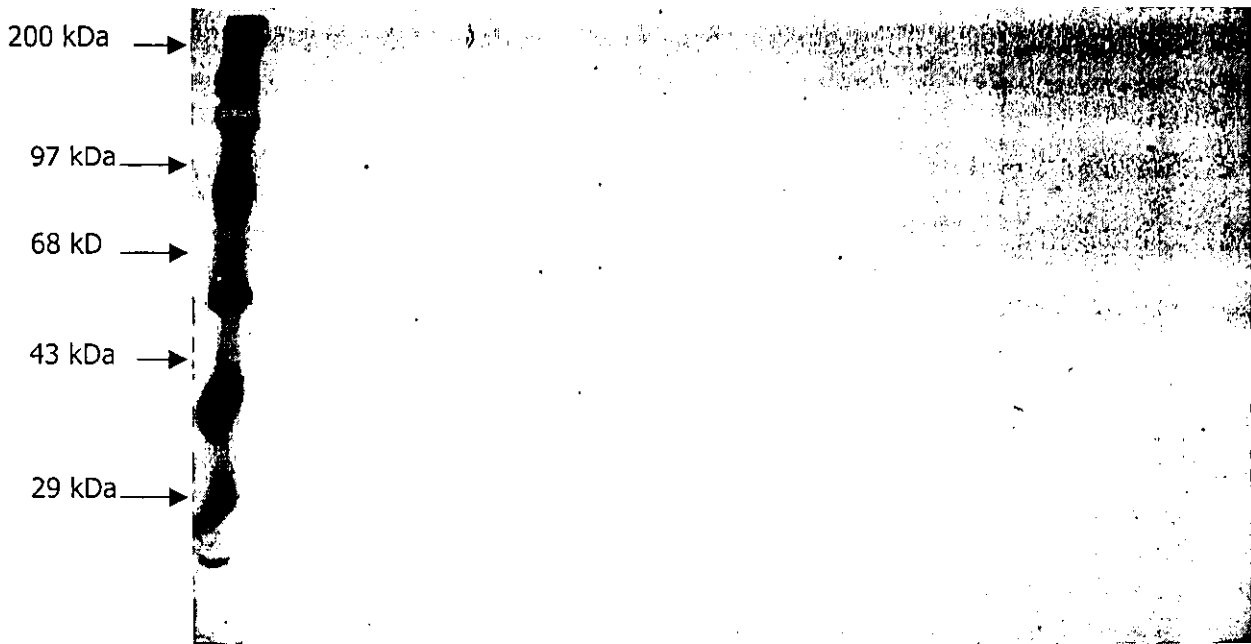


Fig. 19. Western blot de proteínas ribosomales de *E. histolytica* separadas en geles bidimensionales y transferidas a membrana de nitrocelulosa, incubada con el anticuerpo α -QM dirigido contra la proteína L10 y revelada con un α -IgG acoplado a Peroxidasa como 2° anticuerpo. PH 5.0

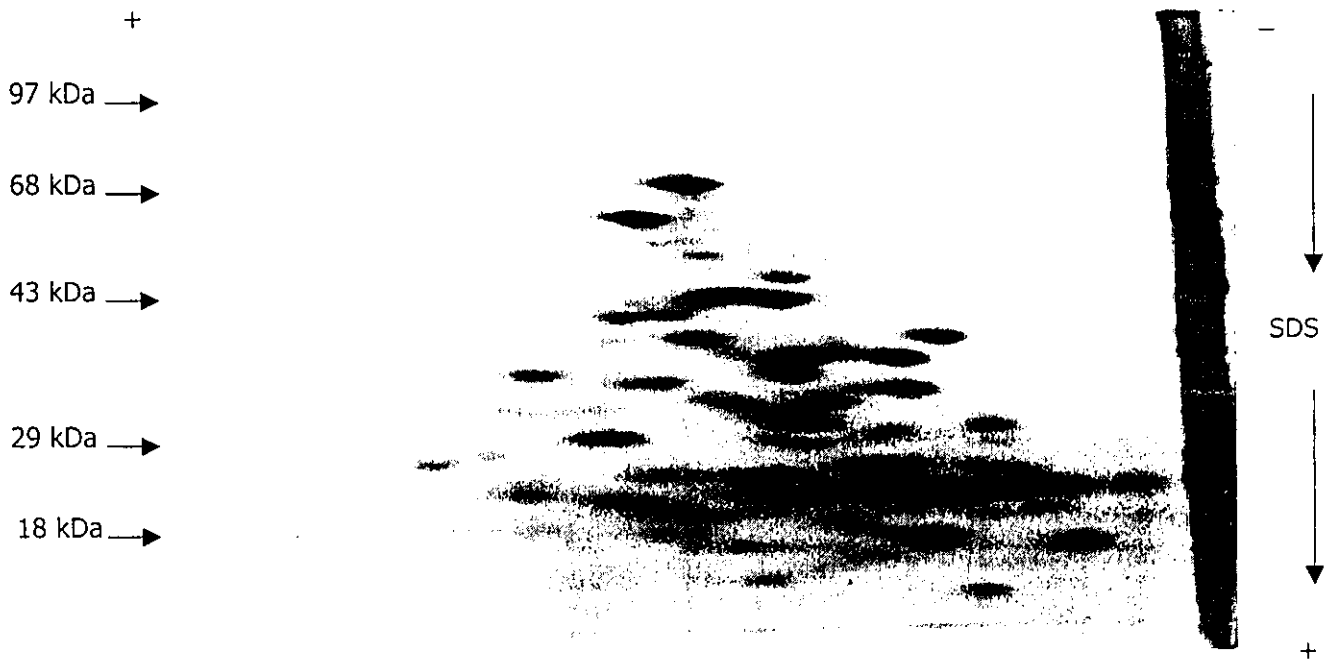


Fig. 20. Electroforesis bidimensional de proteínas ribosomales de *S. cerevisiae*.

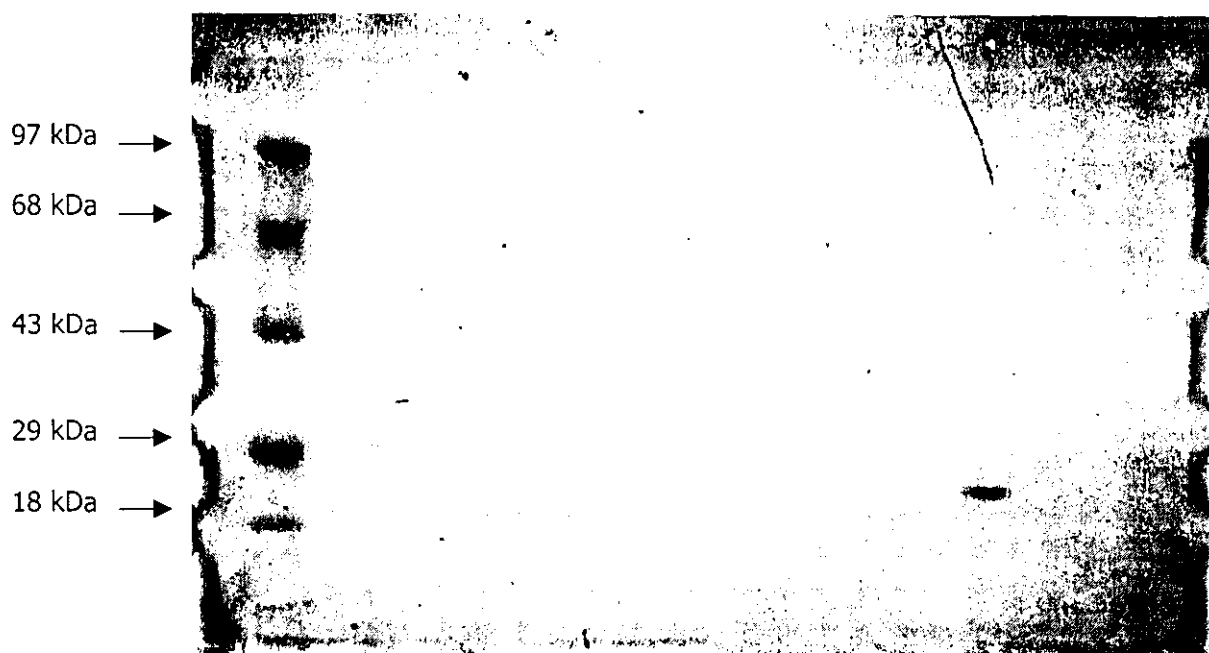


Fig. 21. Western blot de proteínas ribosomales de *S. cerevisiae* separadas en geles bidimensionales y transferidas a membrana de nitrocelulosa, incubada con el anticuerpo α -QM dirigido contra la proteína QM de levadura y revelada con un α -IgG acoplado a Peroxidasa como 2° anticuerpo.

Análisis estructural de la proteína *EhL10*.

El alineamiento de las secuencias peptídicas de los 9 homólogos analizados de QM se observan en la Fig. 13, el alto grado de conservación a través de la evolución es evidente. La QM de ratón diverge solo en 1% respecto a la de humano, la proteína QM de pollo solo el 6% es divergente comparada con la proteína QM de humano y ratón, las dos formas de plantas solo divergen una de la otra en 13%, y entre los péptidos de humano y levadura divergen en un 33%. Estos altos niveles de conservación están concentrados en los primeros 175 residuos de la proteína, en contraste, la región carboxi-terminal atraviesa aproximadamente 40 aminoácidos de los cuales solo cuatro residuos son conservados al 100%. Aun así, muchos de los cambios entre los aminoácidos 175-200 son conservativos. La predicción de la estructura secundaria de la proteína *EhL10* sugiere que puede contener dos α -hélices (residuo 55- 65 y residuo 140- 165) separadas por 65 residuos, presenta ocho estructuras β -plegadas a lo largo de su secuencia las cuales pueden formar el "core" de la proteína, estas estructuras β -plegada contienen las α -hélices. La primer hélice incluyen el dominio ácido, este es precedida por un dominio básico amino-terminal que es rico en prolinas. La última hélice contiene el segundo dominio básico y es seguido por la secuencia divergente carboxi-terminal; además *EhL10* contiene varias estructuras denominadas Turns (vuelta).

Por otro lado los análisis del PLOT y el PLOTSTRUCTURE (Fig. 25), revelaron que la secuencia de *EhL10* es idéntica a la proteína L10 de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 22), a la proteína L10 de *Drosophila melanogaster* (Fig.23) y a la proteína QM de humano (Fig.24a). Esta proteína además es altamente hidrofílica con una gran cantidad de estructura α -hélices, β -plegadas, Turns y dos sitios de glicosilación (Fig.24b) los cuales no están reportados en QM de humano.

Fig. 22. DotPlot. Alineamiento del gene L10 de *Arabidopsis thaliana* con el gene *EhL10* de *Entamoeba Histolytica* , que es referida como *jif-1*.

DOTPLOT of: jif-Ath.pnt Density: 252.27 April 3, 19100 18:36

COMPARE Window: 30 Stringency: 11 Points: 225

L10Ath ck: 9,184, 1 to 220

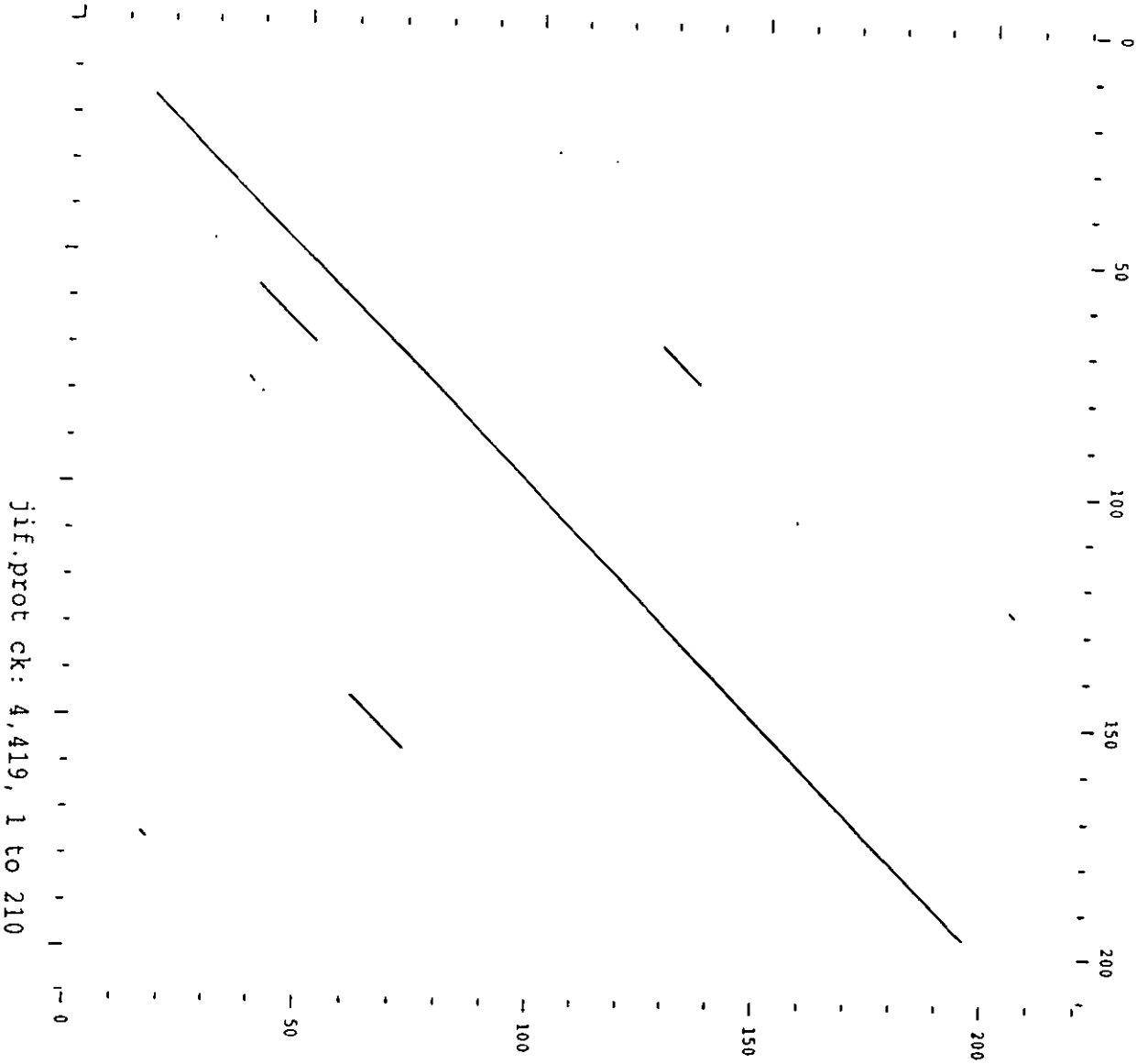


Fig. 23. DotPlot. Alineamiento del gene L10 de *Drosophila melanogaster* con el gene *EhL10* de *Entamoeba Histolytica* , que es referida como *jif-1*.

DOTPLOT of: jif.pnt Density: 250.00 April 3, 19100 18:36

COMPARE Window: 30 Stringency: 11 Points: 227

L10Droso ck: 3,942, 1 to 218

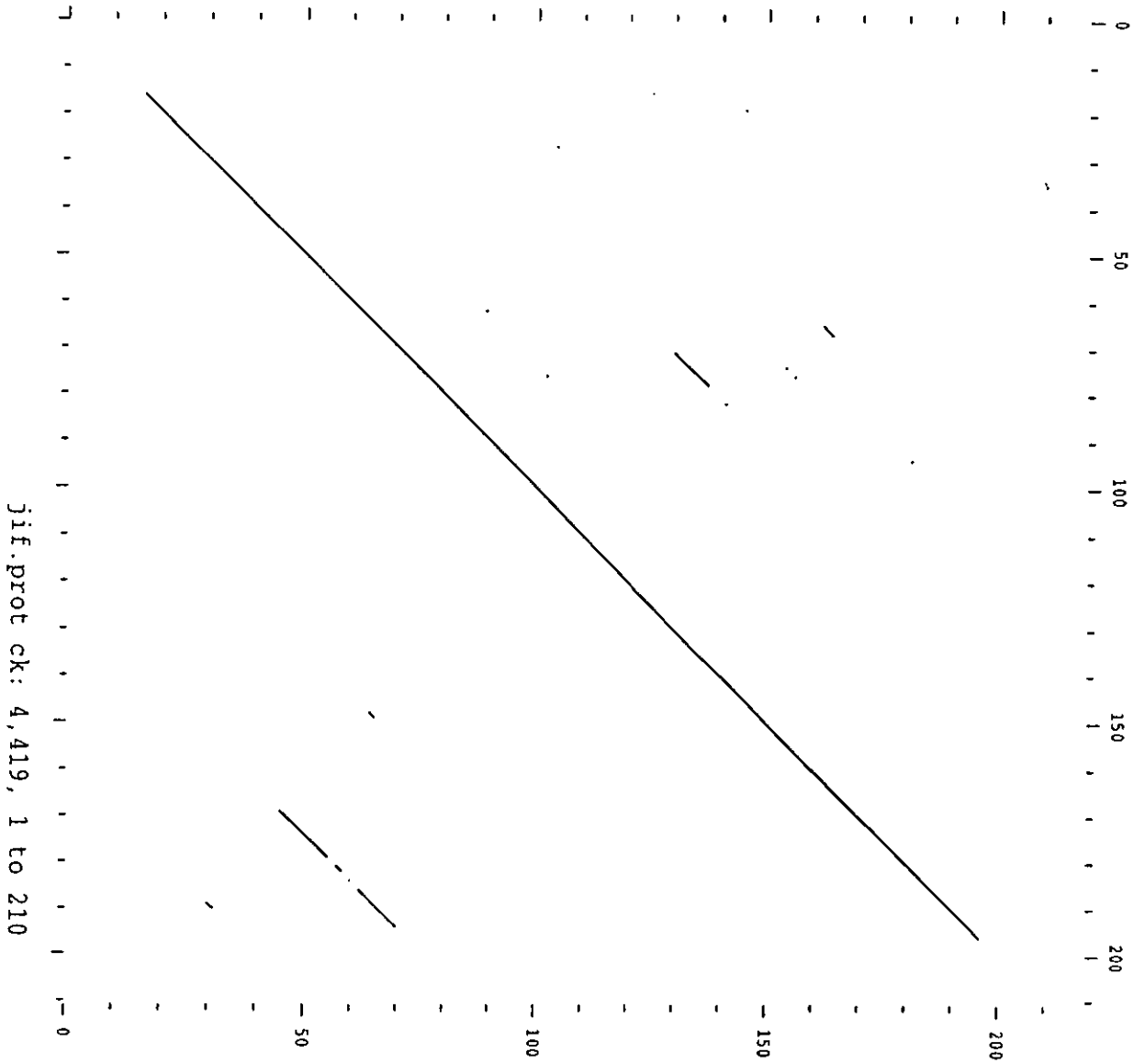


Fig. 24a. DotPlot. Alineamiento del gene L10 de la proteína QM de humano con el gene de la proteína *EhL10* de *Entamoeba Histolytica* , que es referida como *jif-1*. Panel A: una fuerte homología fue encontrada entre ambas proteínas. Panel B: Plot structure de la proteína a partir de la secuencia en aminoácidos de *EhL10*, dos sitios de glicosilación son indicados.

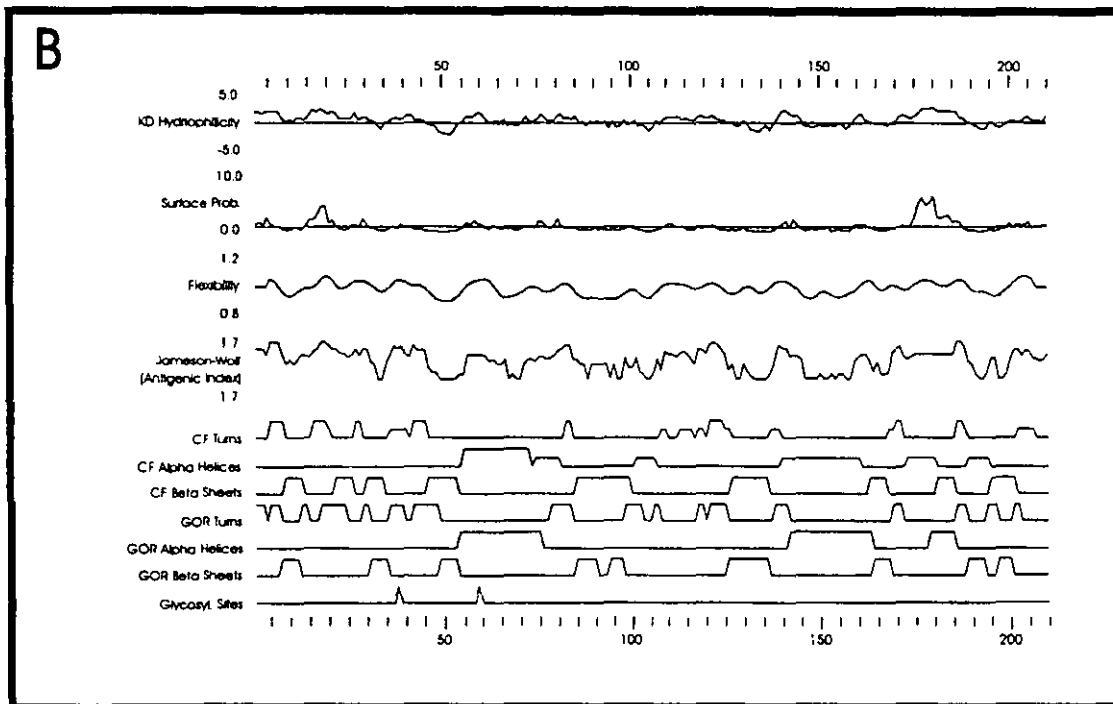
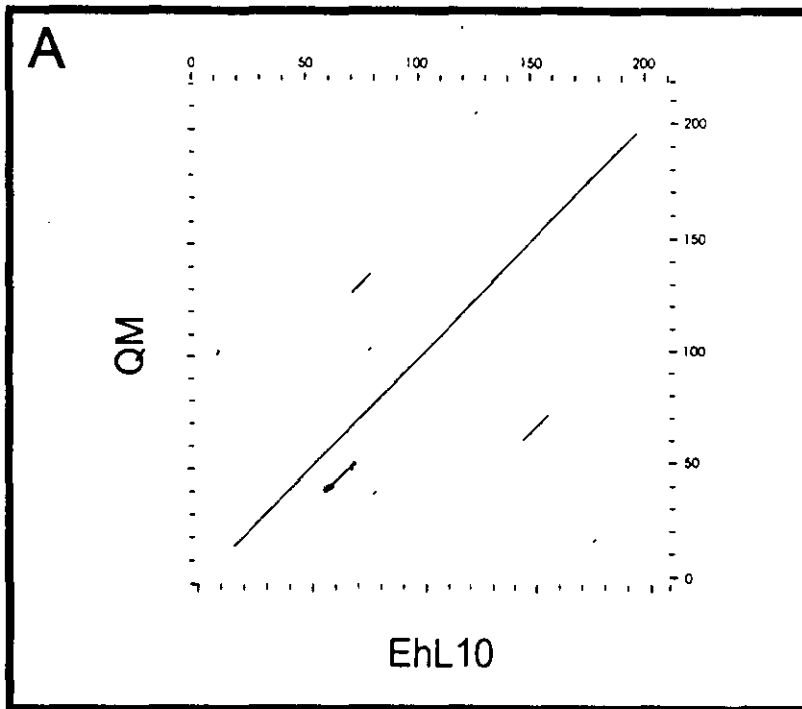


Fig. 24b. Plot structure. Análisis de estructuras secundarias en la proteína EhL10 de *Entamoeba Histolytica* mediante el programa GCG. Plot structure de la proteína a partir de la secuencia en aminoácidos de *EhL10*, dos sitios de glicosilación son indicados.

PLOTSTRUCTURE of: jif.p2s April 3, 19100 12:01

PEPTIDESTRUCTURE of: jif.prot Ck: 4419, 1 to: 210

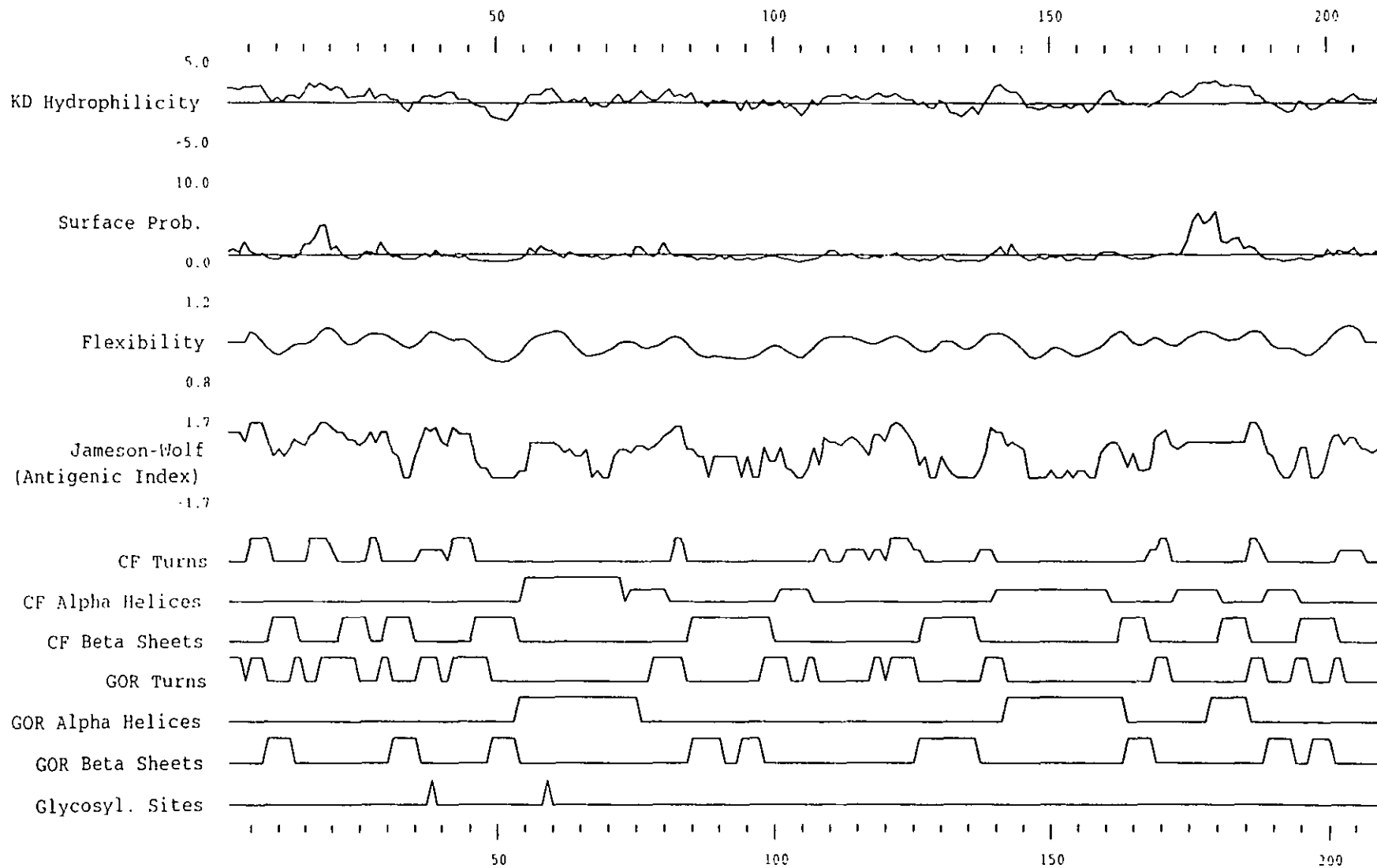
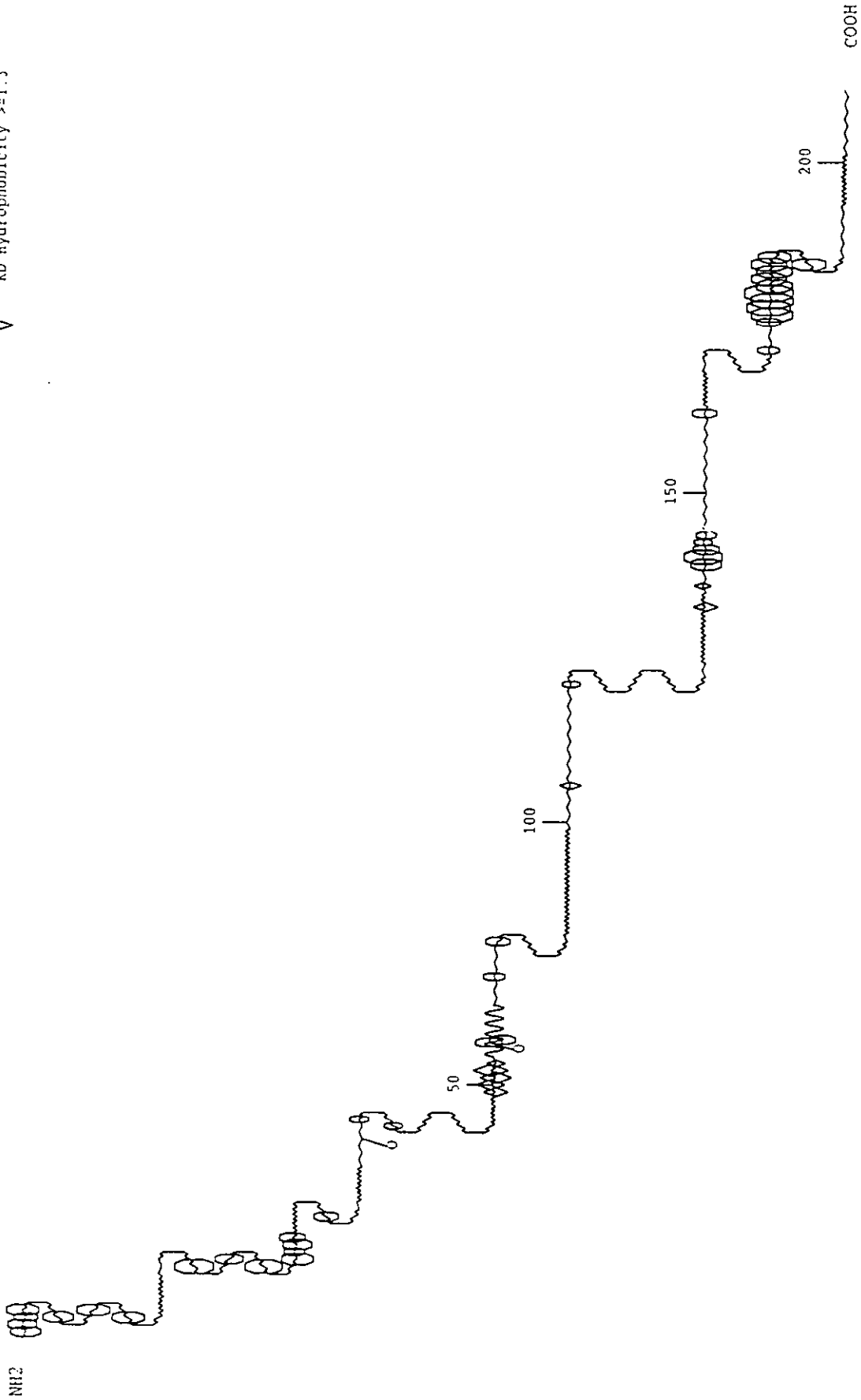


Fig. 25. Plot structure. Estructura de la proteína *EhL10* de *Entamoeba Histolytica*, representación esquemática de las estructuras secundarias presentes en la proteína ribosomal L10 de *E. Histolytica*.

PLOTSTRUCTURE of: jif.prot ck: 4419

Chou-Fasman Prediction
April 3, 1976 12:01

0 KD Hydrophilicity >=1.3
◇ KD Hydrophobicity >=1.3



7 DISCUSIÓN.

El análisis de homología del gene *EhL10* a través del Genbank reveló que este codifica para una proteína ribosomal L10 la cual esta muy relacionada con algunas proteínas a partir de diversas especies de eucariotes las cuales incluyen: la proteína QM de humano con un 57% de identidad (Dowdy y col., 1991), la proteína supresora del tumor de Wilm's en *Arabidopsis thaliana* con un 59% de identidad (Rivera-Madrid y col., 1993), la proteína de unión a *Jun* (*jif-1*) en pollo con un 55% de identidad (Monteclaro y Vogt, 1993), y con la proteína homóloga a QM en rata con un 57% de identidad (Chan y col., 1996). Así que el cDNA de *EhL10* codifica para una proteína de 23.9 kDa, homóloga a la proteína QM que pesa 25 kDa y que es una proteína altamente conservada (Farmer y col., 1994), lo cual ha sido demostrado por ser esencial en *Saccharomyces cerevisiae* (Tron y col., 1995).

Excluyendo los primeros cinco residuos amino-terminal, los cuales no se muestran en el alineamiento y el desconocimiento que concierne al residuo 50 en ratón, la secuencia peptídica de QM en ratón y humano son idénticas excepto en un residuo (Ser 202 en humano es remplazada por una Asn en ratón), en el caso de la secuencia de la proteína ribosomal L10 de rata (no mostrada) es idéntica a la proteína QM de humano, excepto por el cambio de un solo aminoácido (Ser 202 en humano es remplazada por una Asn en rata). Así que comparando estructuralmente la proteína *EhL10* de *Entamoeba histolytica* con la proteína QM de humano la cual es altamente básica, se observa que contiene cuatro regiones muy conservadas; dos dominios básicos, un dominio ácido y una región de residuos básicos y ácidos (Fig. 13). El primer dominio básico comprende los primeros 32 aminoácidos N-terminal de los cuales 10 son básicos, en *Entamoeba histolytica* presenta 11 aminoácidos básicos; esta región es rica en prolina (13%), después de este dominio se encuentra una región de aminoácidos cargados que contiene un bloque de 3 a 4 residuos básicos rodeado de 3 residuos ácidos, se sugiere que en esta región hay una α -hélice (Phe 34 a Phe 45). En *Entamoeba histolytica* este bloque de 3 a 4 aminoácidos es remplazado por un solo residuo ácido. El segundo dominio básico comprende los residuos 150-175 y contiene 9 residuos básicos que son conservados en todos los homólogos de QM excepto en levadura (Arg 162 a Gln y Lys 174 a Asn), y en amiba que tiene solo 7 residuos básicos (en QM de humano el residuo ácido glutámico (Glu) 150 es sustituido (cambiado) en amiba por Lys; Arg 154 por Leu; Lys 169 por Asn). El primer segmento de este dominio (Glu 150 a Phe 159) cae dentro de una α -hélice anfipática que lo precede. A la mitad de este dominio conservado puede formar un loop con los residuos alrededor de Gly 161 y Gly 172 formando un β -turns, los residuos 180-187 forman una α -hélice. El dominio ácido conservado Glu 56 a Arg 70 contiene 4 residuos ácidos, semejante al segundo dominio básico, esta región cae dentro de una α -hélice anfipática que lo precede. La región entre el final del dominio ácido y el inicio del segundo dominio básico contiene un gran estrecho de residuos conservados en toda la proteína, todos los residuos entre Gly 81 y Gly 124, excepto 4, son conservados en seis de los homólogos. Solo tres cambios (Phe 94 por Ser en *Arabidopsis thaliana* , Leu o Val 90 por Lys y Ile o Leu 97 por Thr en *C. elegans*); y cinco cambios en *Entamoeba histolytica* (Ile 87 por Val, Leu 91 por Ile, Phe 119 por Trp, Pro 122 por Ser y Glu 123 por Tyr), el grado de conservación de estos residuos sugiere que este segmento puede formar el centro de la proteína (β -plegada). La prolina conservada en la posición 93 que esta

flanqueada por histidinas conservadas, puede formar un β -turn. El dominio rico en Glicina (Ser 104 a Gly 124) contiene cinco Glicinas y tres Alaninas; el dominio rico en Glicina seguido del β -plegada es marca común para proteínas de unión a nucleotidos. Con la excepción del dominio C-terminal, los residuos 125-149 comprende la última región conservada de la proteína. Solo la mitad de los residuos son conservados en todos los homólogos. Sin embargo, los residuos 127-140 están predeterminados para formar una β -plegada, mientras que la periodicidad de los residuos polares y cargados entre 141 y 149, sugiere una α -hélice que podría extenderse dentro de la hélice del segundo dominio básico.

Mediante el uso de un programa de computación denominado GCG se analizó la homología de la proteína L10 de *Entamoeba histolytica* (referida como *jif*) con otras proteínas por medio de un PLOT; dejando en claro que la proteína L10 de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 22), la proteína L10 de *Drosophila melanogaster* (Fig. 23) y la proteína QM de humano (Fig. 24a) son idénticas a la proteína L10 de *Entamoeba histolytica* (*EhL10*). Por otro lado el uso del PLOTSTRUCTURE, reveló que *EhL10* es una proteína altamente hidrofílica, con α -helices y β -plegadas, además de dos sitios de glicosilación (Fig. 24b). Generalmente una proteína hidrofílica es representada por proteínas nucleares. Las interacciones entre proteínas son mediadas por estructuras α -helices, además la estabilidad de estas interacciones está dada por estructuras β -plegadas. Este programa nos permitió definir la estructura secundaria de la proteína *EhL10* (Estructuras α -helices, β -plegada, estructuras Turns, índice de antigenicidad e hidrofiliidad (Fig. 25). Datos que demuestran que la proteína QM de humano es capaz de unirse al transactivador nuclear *c-jun* (Inada y Col., 1997), y su capacidad de reprimir su habilidad para transactivar promotores que contienen secuencias de unión AP-1, nos indica que esta proteína QM presenta dominios conservados los cuales están involucrados en la actividad de unión a DNA. La alta conservación de QM revela factores estructurales interesantes, notablemente la conservación de los dominios básicos y ácidos. El dominio básico se ha asociado con la actividad de unión al DNA, el dominio ácido, a helices anfipáticas con activación transcripcional. Mientras que deja en claro que QM puede des-regular la actividad de *c-jun*. Ambos dominios básicos tiene toda la marca de motivos de unión a DNA (Farmer y col., 1994). En comparación con varios homólogos a QM han revelado su conservación por ser concentrada en los dominios ácidos y básicos. Estos resultados indican que QM puede unirse hacia *c-jun* y hacia el DNA sugiriendo la posibilidad existente de que QM es el primer miembro de una novedosa clase de proteínas conservadas y que regulan la transcripción, al igual que la proteína *EhL10* de *E. Histolytica*, la cual presenta los mismos dominios de unión al DNA de QM y están altamente conservados lo que nos hace pensar que la proteína *EhL10* podría tener una función similar al de la proteína QM de humano.

A diferencia de la proteína QM de humano, la proteína ribosomal L10 de *Entamoeba histolytica* (*EhL10*) presenta dos sitios de glicosilación en su estructura secundaria (Asn 38- Ser 40 y Asn 59 - Ser 61). Todas aquellas proteínas que pasan a través del retículo endoplásmico y el aparato de golgi son glicosiladas. Estas glicoproteínas son generadas por la adición de un grupo oligosacarido hacia el grupo amino de la aspargina (Asn) o hacia el grupo OH de la serina o treonina. La glicosilación ligada al amino es iniciada en el retículo endoplásmico y completada en el aparato de golgi. El grupo aceptor es un residuo de aspargina que está localizada en la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Prolina), la glicosilación es

importante no solo por su consecuencia estructural si no porque ocurre como parte de un complejo aparato para el transporte de proteínas a través de la célula (Lewin, 1997). Estos sitios de glicosilación no estan reportados en la proteína QM de humano, en la proteína *jif-1* de pollo ni en la proteína L10 de rata y los cuales estan presentes en la proteína ribosomal L10 de *Entamoeba histolytica* , lo que nos indica que esta proteína es glicosilada con el fin de ser transportada.

De acuerdo a estas características estructurales de la proteína QM, al igual que *jif-1* y otras proteínas homólogas se demuestra que no presentan zipper de leucina pero reconocen la región del zipper de leucina de *c-jun* para unirse al DNA por lo cual la comparación de varios homólogos a QM confirman que esta conservación de los dominios básicos y ácidos son necesarios para que QM pueda unirse a *c-jun* y al DNA, dejando en claro la posibilidad de que QM al igual que *jif* son los primeros miembros de una clase de proteínas reguladoras de la transcripción altamente conservadas. Esta proteína presenta mucha similitud con otras proteínas relacionadas, sin embargo, muchas de las diferencias entre los residuos 176-200 son conservativas (Farmer y col., 1994). De acuerdo con esto podemos pensar que la proteína QM es capaz de compartir motivos funcionales, motivos de interacción (unión) y de regulación con las proteínas homólogas de diversas especies como por ejemplo la proteína *EhL10* de *Entamoeba histolytica* (Fig.25).

Las interacciones entre proteínas son generalmente mediadas por motivos de unión a DNA tales como: zippers de Leucina (Vogt y Bos, 1990) e inclusive α -hélices; la proteína *jif-1* se une a la región del zipper de leucina de *c-Jun* e inhibe la unión al DNA así como la transactivación de la transcripción (Montecarlo y Vogt, 1993). La proteína *jif-1* no tiene zipper de leucina. Esta proteína esta muy relacionada con la proteína QM de humano y por lo tanto con la proteína L10 de rata, no es difícil imaginar la habilidad de la proteína ribosomal L10 de pollo (*jif-1*) para unirse a *c-Jun* y suprimir la expresión de genes a causa de la actividad supresora que presenta la proteína QM de humano (tambien referida como proteína ribosomal L10). La supresión de la transformación y la transactivación por L10 son ejemplos de funciones extra-ribosomales de proteínas ribosomales (Wool, 1993; Wool, 1995, 1996). Dichas interacciones podrían estar mediadas por motivos de unión al DNA ya mencionados, los cuales son sustituidos por los dominios básicos y ácidos de la proteína QM de humano y de las proteínas homólogas (*jif-1*, L10 de rata y de amiba).

La función que se la atribuye a QM (*Jif-1*) es la inhibición de la transcripción activada por *c-Jun*. Mientras que ensayos de interacción entre QM y *jif-1* demuestran que realmente hay una interacción entre ambas (Montecarlo y Vogt, 1993). Para lo cual en el caso de *EhL10* su posible interacción esta en vias de ser comprobada, de ser así, estaríamos hablando de una proteína que esta implicada en la regulación de *c-Jun* en amiba y por lo tanto en el control de muchos mecanismos de virulencia de *Entamoeba histolytica*.

Por otro lado las proteínas reconocidas por Western Blot mediante el uso de los anticuerpos α -*EhL10* y α -QM, revelaron que: en el caso de la proteína detectada sobre proteína ribosomal total de amiba mediante el anticuerpo α -*EhL10*, fue una proteína básica de aproximadamente 24 kDa; para la proteína detectada sobre proteína ribosomal de amiba con el anticuerpo α -QM, revelo una banda de aproximadamente 24 kDa, pero es una proteína muy ácida, en comparación a la detectada en proteína ribosomal de levadura

con el mismo anticuerpo. Esto podría interpretarse de la siguiente manera: que son proteínas diferentes las detectadas por el anticuerpo α -*EhL10* a las detectadas por el anticuerpo α -QM, en referencia al tipo de migración mientras que una es básica (+), las otras dos son ácidas (-), sin embargo las proteínas parecieran tener un peso similar de aproximadamente 24 kDa, pero al parecer no son las mismas proteínas.

8 CONCLUSIONES.

1.- El gene aislado de *EhL10* a partir de la librería de cDNA de *Entamoeba histolytica*, codifica para una proteína de 23.9 kDa, la cual presenta una alta homología con la proteína QM de humano, la proteína *jif-1* de pollo y a la proteína ribosomal L10 de rata.

2.- El gene se secuenció y se analizó en una base de datos GenBank y estructuralmente *EhL10* presenta los mismos dominios de unión a DNA que se presentan en las proteínas QM, *jif-1* y la proteína ribosomal L10. Estos dominios están implicados en la interacción con el factor de transcripción *c-Jun*, producto del proto-oncogene *c-Jun*.

3.- Se obtuvieron anticuerpos α -*EhL10* contra la proteína recombinante *EhL10*.

4.- Se localizó la proteína *EhL10* en proteínas ribosomales de *Entamoeba histolytica* y la proteína QM en *E. histolytica* y *S. cerevisiae*.

5.- Al parecer las proteínas detectadas con los anticuerpos α -*EhL10* y α -QM, no son las mismas, ya que en el caso α -*EhL10* detectó una proteína básica, mientras que el anticuerpo α -QM detectó una proteína ácida.

6.- Análisis estructurales mediante el PLOT y el PLOTSTRUCTURE reveló que la proteína QM de humano al igual que la proteína L10 de rata y la proteína *jif-1* de pollo son idénticas a la proteína L10 de *Entamoeba histolytica* (*EhL10*), además la proteína *EhL10* presenta dos sitios de glicosilación, los cuales no están presentes en QM de humano, de pollo, de ratón y de rata; excepto en dos proteínas, pero con un solo sitio de Glicosilación y son la proteína L10 de *Arabidosis thaliana* y la de trigo (posición Asn 59 – Ser 61).

7.- Al parecer En este trabajo se encontraron dos proteínas totalmante diferentes; por un lado la proteína L10 de *Entamoeba histolytica* y por el otro la proteína homóloga a QM en *E. histolytica*; además de identificar la proteína QM de *S. cerevisiae*.

Isolation and Identification of L10 Gene from *Entamoeba histolytica* Homologous to Wilms' Tumor Suppressor

Ramses Chávez-Ríos and Miguel Vargas-Mejía

Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Mexico City, Mexico

Key Words: *Entamoeba histolytica*, L10, QM, Jif-1.

Introduction

There is evidence that a number of ribosomal proteins have a second function in addition to forming part of ribosomes and synthesis. Qm is one of the ribosomal proteins with extraribosomal functions (1). This molecule was isolated originally as a putative Wilms' tumor suppressor (2). Subtractive cDNA/RNA hybridization between a tumorigenic parent and nontumorigenic hybrid with a der(11) chromosome led to the identification of a single cDNA that encodes a protein that is the Wilms' tumor suppressor, and that was designated QM. QM is nearly identical to rat L10 and Jif-1. Jif-1 binds specifically to the leucine zipper region of Jun (3), and inhibits the binding of *c-jun* to DNA and transactivation of transcription, which contains an AP-1 consensus site. QM/Jif-1 can regulate negatively AP-1 function-activated transcription by *c-fos* and *c-myc* both *in vitro* and *in vivo*. Because AP1 activates the transcription of *c-myc* and *c-fos*, it might have an important role in the control of cell proliferation. On the other hand, *Entamoeba histolytica* presents several phenotypical characteristics similar to a tumorigenic cell. Two of the most important are invasiveness and metastasis. In the present work, we show the cloning and sequencing of cDNA coding for ribosomal protein EhL10 from *E. histolytica*. Additional studies of EhL10 gene will help identify the function of this protein in this parasite.

Materials and Methods

Cloning of the EhL10 gene. Degenerate oligonucleotide primers corresponding to conserved regions of the functional domain of the *Arabidopsis thaliana* Qm gene were used to ob-

tain an *E. histolytica* probe by PCR. PCR was performed using 100 ng of *E. histolytica*, 1.5 mM of each primer, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham, Cleveland, OH, USA), 200 μ M of each dNTP in a total volume of 100 μ L of buffer solution provided by the manufacturer (USB; 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 1.5mM MgCl₂). The conditions for PCR included 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 39°C for 1 min, and extension by Taq polymerase at 72°C for 1 min. This PCR-amplified fragment was radioactively labeled with [α -³²P]dATP using random primer DNA labeling kit (Amersham), and used as probe to isolate the complete EhL10 gene by screening a cDNA library constructed in λ ZAP II. Positive plaques were purified by two rounds of plating and hybridization. The pBluescript phagemid was recovered by excision of double-stranded plasmid clones isolated according to protocols described by the manufacturer and sequenced by T7 Sequenase V2.0 Sequencing Kit (Amersham). The sequencing data was analyzed using the Genetics Computer Group GCG program (Wisconsin).

Results and Discussion

Screening of an *E. histolytica* cDNA library allowed the isolation of the complete EhL10 cDNA. It contains a 642-bp open reading frame encoding a predicted 25.8-kDa protein. The EhL10 protein showed 73% identity with the QM gene from *Arabidopsis thaliana* (Figure 1A). Analysis of EhL10 sequence revealed that it contains all the structural elements identified in Qm and Jif-1 proteins. EhL10 has two highly conserved basic and acidic domains. The basic domains have been associated with DNA binding activity, and the acidic ones with transcriptional activation. From the sequence alignments, it is clear that there has been considerable conservation of the QM peptide sequence throughout evolution. The plotstructure (Figure 1B) of the EhL10 structure prediction shows that EhL10 protein has α -helices and β -sheet regions, while the hydrophobicity pattern of this do-

Address reprint requests to: Miguel Angel Vargas-Mejía, Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F., México. Tel.: (+525) 747-7000, ext. 5015; FAX (+525) 747-7134; E-mail: mavargas@mail.cinvestav.mx
Presenting author: Ramses Chávez-Ríos.

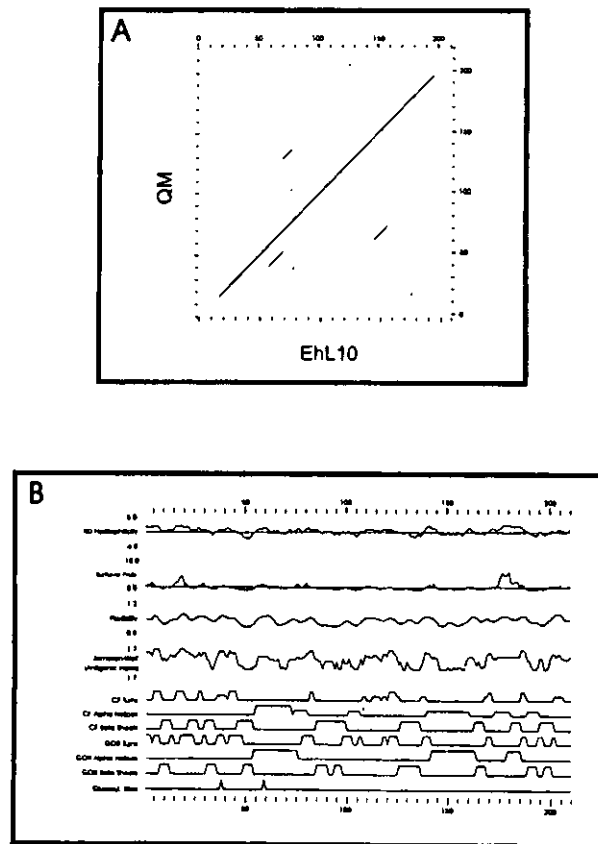


Figure 1. Dot-plot analysis of *E. histolytica* EhL10 gene. The comparison between EhL10 and QM from *A. thaliana* is shown. The dot-plot function was determined by using the GCG program. The window size was 30 residues, and the minimum score was 16. A strong homology was found (A). A plot structure of the protein-derived amino acid sequence of EhL10, two glycosylation sites, are indicated (B).

main is very similar to QM protein. The study of the role of EhL10 in *E. histolytica* is in progress.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the NORD-SUD IN-SERM program (No. 4N0016) and Conacyt (Mexico) (No. 32050).

References

1. Wool IG. Extraribosomal function of ribosomal proteins. Trends Biochem Sci 1996;21:164.
2. Dowdy SF, Lai BE, Weissman Y, Matsui BL, et al. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. Nucleic Acids Res 1991;19:5763.
3. Monteclaro FS, Vogt, PK. A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:6726.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ackers, J. P. (1996). The invasiveness of *Entamoeba histolytica* – a continuing enigma. J. Clin. Pathol. Mol. Pathol 49: 192-198.
- Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzel, H., Dagerlind, A., Boman, H. G. y Gudmundsson, G. H. (1995). NK-Lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *Embo J.* 14:1615-1625.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. y Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*: 729-739.
- Angel, P., Allegreto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. y Karin, M. (1988, 1988b). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*. 332:166-171.
- Angel, P. y Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1072: 129-157.
- Arroyo, R. y Orozco, E. (1987). Localization and Identification of *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 23:151-158.
- Bakker-Grunwald, T. y Wöstmann, C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukariotic cell. *Parasitol. Today*. 9:27-31.
- Bailey, G. B., Leitch, G. J. y Day, D. B. (1985). Chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* 32:341-346.
- Becker, I., Pérez-Tamayo, R., Montfort, I., Alvizouri, A. M. y PérezMontfort, R. (1988). *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp. Parasitol* 67: 268-280.
- Benitez, B. L., Amezcua, J. L., Villanueva, C. y Freyre, R. (1985). Circulating platelet-microaggregates in patients with invasive carcinoma of the cervix. *Res. Med. Sci.* 13: 91-92.
- Bernheimer, A. W. y Rudy, B. (1986). Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. 846:123-141.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. y Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a protein with antigenic and enhancer binding properties of transcription factor AP-1. *Science*. 238: 1386-1392.

Bohmann, D., Admon, A., Turner, R. y Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation by the AP-1 family of enhancer binding proteins: A nuclear target for signal transduccion. Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol. 53: 695-700.

Boman, H. G. (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. Cell. 65:205-207.

Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. y Vogt, P. K. (1988). V-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. Cell. 52: 705-712.

Bos, T. J., Rauscher III, F. J., Curran, T. y Vogt, P. K. (1989). The carboxy terminus of the viral jun oncoprotein is required for complex formation with the cellular fos protein. Oncogene. 4: 123-126.

Braga, L. L., Ninomiya H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., y Petri W.A Jr. (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 90:1131-1137.

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

Chan, Y. L., Suzuki, K., Olvera, J. y Wool, I. G. (1993). Zinc finger-like motifs in rat ribosomal proteins S27 and S29. Nucleic Acids Res. 21(3): 649-655.

Chan, Y. L., Olvera, J., Glück, A. y Wool, I. G. (1994). A Leucine Zipper-like Motif and a Basic Region-Leucine Zipper-like Element in rat Ribosomal Protein L13a. J. Biol. Chem. 269(8): 5589-5594.

Chan, Y. L., Diaz, J. J., Denoroy, L., Madjar, J. J. y Wool, I. G. (1996). The primary structure of rat ribosomal protein L10: Relationship to a jun-binding protein and to a putative Wilms' Tumor supressor. Biochem. Biophys. Res. Com. 225: 952-956.

Curran, T., Rauscher III, R. J., Cohen, R. D. y Franza, B. R. Jr. (1989). Beyond the second messengers: oncogenes and transcription factors. Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol. 53: 769-778.

Daimond, L. S. y Clark, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudin, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J. Eukaryont Microbiol. 40:340-344.

Daimond, L. S., Harlow, D. R. y C. C. Cunnick. (1978). A new medium for the axenic cultivatin of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba* . Trans. Roy. Trop. Med. Hyg. 72:431-432.

Denmat, S. H-L., Sipiczki, M y Thuriaux. P. (1994). Suppression of Yeast RNA Polymerase III Mutations by the URP2 Gene Encoding a Protein Homologous to the Mammalian Ribosomal Protein S20. J. Mol. Biol. 240: 1-7.

- Dick, F. A., S. Karamanou, y B L. Trumpower. (1997). QSR1, an essential yeast gene with a genetic relationship to a subunit of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex, codes for a 60S ribosomal subunit protein. *J. Biol. Chem.* 272: 13372-13379.
- Dowdy, S. F., Lai, K. M., Weissman, B. E., Matsui, Y. , Hogan, B. L. M. y Stanbridge, E. J. (1991). The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic. Acids. Res.* 20: 5763-5769.
- Edman, U., Meraz, M. A., Rausser, S., Agabian, N., y Meza, I. (1990). Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 172:879-888.
- Eisinger, D. P., Jiang, H. P. y Serrero, G. (1993). A novel mouse gene highly conserved throughout evolution: regulation in adipocyte differentiation and in tumorigenic cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1227-1232.
- Eisinger, D. P., Dick, F. A. y Trumpower, B. L. (1997). Qsr1p, a 60 s ribosomal subunit protein, is required for joining 40 S and 60 S subunits. *Mol. and Cell. Biol.* 17: 5136-5145.
- Farmer, A., Loftus, T. M., Mills, A., Sato, K., Neill, J., Tron, T., Yang, M., Trumpower, B. L. y Stanbridge, E. J. (1994). Extreme evolutionary conservation of QM, a novel c-jun associated transcription factor. *Hum. Mol. Genet.* 5: 723-728.
- Fisher, E. M. C., Romero-B, P., Brow, L. G., Ridley, A., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Willard, H. F., Beiber, F. R y Page, D. C. (1990). Homologous Ribosomal Protein Genes on the Human X and Y Chromosomes: Escape from X Inactivation and Possible Implications for Turner syndrome. *Cell.* 63: 1205-1218.
- García-Rivera, G., Rodríguez, M. A., Ocadiz, R., Martínez-López, M. C., Arroyo, R., González-Robles. y Orozco, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology.* 33 (3): 556-568.
- Gentz, R., Rauscher III, R. J., Abate, A. y Curran, T. (1989). Parallel association of fos and jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science.* 243: 1695-1699.
- Gorenstein, C. y Warner, J. R. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:547.
- Guerrant, R. L. (1986). The global problem of amebiasis: current status research needs and opportunities for progress. *Rev. Infec. Dis.* 218-227.
- Gramatikoff, K., schaffner, W, y Georgiev, O. (1995). The Leucine zipper of c-Jun Binds to Ribosomal Protein L18a: A Role in Jun Protein Regulation?. *Biol. Chem.* 376: 321-325.
- Hardy, S. J. S., Kurland, C. G., Voynow, P. y Mora, G. (1969). The ribosomal proteins of *Escherichia coli*. I. Purification of the 30S ribosomal proteins. *Biochemistry.* 8:2897-2905.

Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. y Leder, P. (1988). c-jun dimerizes with itself and fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell*. 55: 917-924.

Hemmerich, P., Von Mikecz, A., Neumann, F., Sözeri, O., Wolff-Vorbeck, G., zoebelein, R. y Krawinkel, U. (1993). Structural and functional properties of ribosomal protein L7 from humans and rodents. *Nucleic Acids Research*. 21: 223-231.

Horstmann, R. D., Leippe, M. y Tannich, E. (1992). Recent progress in the molecular biology of *Entamoeba histolytica*. *Trop. Med. Parasitol.* 43:213.

Inada, H., Mukai, J., Matsushima, S. y Tanaka, T. (1997). QM is a novel zinc-binding transcription regulatory protein: Its binding to c-jun is regulated by zinc ions and phosphorylation by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230:331-334.

Ito, Y. (1992). Purification and partial identification of bone-inducing protein from a murine osteosarcoma. *Biochem. J.* 284: 847-854.

Johnson, R. S., Spiegelman, B. M. y Papaioannou, V. (1992). *Cell*. 71: 577-586.

Kaneko, k., Kobayashi, H., Onodera, O., Miyatake, T. y Tsuji, S. (1992). Genomic organization of a cDNA (QM) demonstrating an altered mRNA level in non-tumorigenic Wilms' microcell hybrids cells and its localization to Xq28. *Hum. Mol. Genet.* 7: 529-533.

Keene, W. E. y Col. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 163:536-549.

Keene, W. E., Hidalgo, M. E., Orozco, E., McKerrow, J. H. (1990). *Entamoeba histolytica* : correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of cysteine proteinase. *Exp. Parasitol.* 71:199-206.

Kim, J., Chubatsu, S. L., Admon, A., stahl, J., Fellous, R. y Linn, S. (1995). Implication of Mammalian Ribosomal Protein S3 in the Processing of DNA Damage. *J. Biol. Chem.* 270 (23): 13620-13629.

Kouzarides, T. y Ziff, E. (1988). The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*. 336: 646-651.

Kouzarides, T. y Ziff, E. (1989). *Nature*. 340: 568-571.

Koller, K., Klade, T., Ellinger, A. y Breitenbach, M. (1996). The yeast growth control gene GRC5 is highly homologous to the mammalian putative tumor seppressor gene. *Yeast*. 12: 53-65.

Lauces, A. L. y Barret, A. J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* . *Biochem. J.* 250:903-909.

- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. y McKnight, S. L. (1988). Science. 240: 1759-1764.
- Lavoie, C., Tam, R., Clark, M., Lee, H., Sonenberg, N. y Lasko, P. (1994). Suppression of a Temperature-sensitive *cdc33* Mutation of Yeast by a Multicopy Plasmid Expressing a *Drosophila* Ribosomal Protein. J. Biol. Chem. 269: 14625-14630.
- Lee, W., Mitchell, P. y Tjian, R. (1987^a). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancers elements. Cell. 49: 741-752.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. y Tjian, R. (1987^b). Activation by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. Nature. 325: 368-372.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D. y Müller-Eberhard, H. J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7659-7663.
- Leippe, M. (1992). Membrane perforation by *Entamoeba histolytica*, structural implications derived from the sequence of the pore-forming peptide. Arch. Med. Res. 23:35.
- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., Van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R. D. y Müller-Eberhard, H. J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. EMBO J. 11:3501-3506.
- Leippe, M., Bahr, E., Tannich, E., Horstmann, R. D. (1993). Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 59:101.
- Leippe, M. y Müller-Eberhard, H. J. (1994^a). The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. Toxicology. 87:5-18.
- Leippe, M., Andrä, J. y Müller-Eberhard, H. J. (1994^b). Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2602-2606.
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E. y Müller-Eberhard, H. J. (1994^c). Amoebapores a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. Mol. Microbiol. 14:895-904.
- Leippe, M. (1997). Amoebapores. Parasitol Today. 13: 178-183.
- Leroy, A., Mareel, M., De Bruyne, G., Bailey, G. y Nelis, H. (1995). Metastasis of *Entamoeba histolytica* compared to colon cancer: one more step in invasion. Invasion and Metastasis. 14: 177-191.
- Lewin, B. (1997). Genes VI. Oxford University Press. New. York. Cap. 34: 1027-1033.

- Loftus, T. M. (1996). Physical and functional characterization of the QM gene product. PhD. Thesis, University of California, Irvine. USA.
- Loftus, T. M., Nguyen, Y. H. y Stanbridge, E. J. (1997). The QM protein associates with ribosomes in the rough endoplasmic reticulum. *Biochemistry*. 36: 8224-8230.
- Long-Krug, S. A., Fischer, K. L., Hysmith, R. M. y Ravdin, J. I. (1985). Phospholopase A enzymes of *Entamoeba histolytica* : description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* 152: 536-541.
- Maizel, J. V. (1971). *Methods Virol.* 5:179.
- Mann, B. J. y Col. (1993). Neutralizing monoclonal antibody epitopes of the *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine- rich extracellular domain of the 170 kDa subunit. *Infect. Immun.* 61:1772-1778.
- Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. y Vogt, P. K. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2848-2852.
- Mets, L. J. y Bogorad, L. (1974). Two- Dimensional Polyacrylamide Gel Electroforesis: An Improved Method for Ribosomal Proteins. *Analytical Biochemistry.* 57: 200-210.
- Monteclaro, F. S. y Vogt, P. K. (1993). A jun-binding protein related to a putative tumor seppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6726-6730.
- Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., González-Canto, A., García de León, M. C., Olivos, A. y Tello, E. (1993). Role of cysteine proteinases of *Entamoeba histolytica* in the cytopathogenicity of axenic trophozoites on rat and hamster hepatocytes in vitro. *J. Parasitol.* 79: 98-105.
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American.* Vol. 262:43-46.
- Muñoz, M. L., Calderón, J. y Rojkind, M. (1982). The collagenase of *Entamoeba histolytica* . *J. Exp. Med.* 155: 42-51.
- Muñoz, M. L., Rojkind. M., Calderón, J., Tanimoto, M., Arias-Negrete, s. y Martínez-Palomo, A. (1984). *Entamoeba histolytica* : collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* 31: 468-470.
- McKoy, J. J. y Col. (1993). Structural analysis of the lighth subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose- specific adherence lectin. *J. Biol. Chem.* 268:24223-24231.
- McKoy, J. J., Mann, B. J. y Petri, W. A. Jr. (1994). adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun.* 62: 3045-3050.

Nakabeppu, Y., Ryder, K. y Nathans, D. (1988). DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell*. 55: 907-915.

Navarrete- Espinoza, J., Navarrete- Cadena, E., Escandón- Romero, C., Escobedo. De la Peña, J. Prevalencia de parasitosis intestinal en la población infantil de Santiago Jamiltepec, Oaxaca. *Rev. Med. IMSS (Méx)* 1993. 31:157-161.

Nishimura, T. y Vogt, P. K. (1988). The avian cellular homolog of the oncogene jun. *Oncogene*. 3: 569-663.

Neumann, F., Hemmerich, P., Von Mikecz, A., Peter, H. H. y Krawinkel, U. (1995). human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells. *Nucleic Acids research*. 23 (2): 195-202.

Nucifora, G., Begy, C. R., Erickson, P., drabkin, H. A y Rowley, J. D. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 7784-7788.

Nguyen, Y. H., Mills, A. A. y Stanbridge, E. J. (1998). Assembly of the QM protein onto the 60 S ribosomal subunit occurs in the cytoplasm. *J. Cell. Biochem*. 68: 281-285.

Orozco, E., Martínez- Palomo, A. y Guarneros, G. (1980). Virulencia y propiedades de superficie de *Entamoeba histolytica* . *Archivos de Investigación Médica. México*. 11(suplemento 1): 153-157.

Orozco, E., Benitez-Bibriesca, L. y Hernandez, R. (1994). Invasion and Metastasis Mechanism in *Entamoeba histolytica* and Cancer Cells. Some Common Cellular and Molecular Features. *Mutation Research*. 305: 229-239.

Petri, W. A Jr., Smith, R. D., Schlesinger, P. H. y Ravdin, J. I. (1987). Isolation of galactose-binding lectin which mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest*. 80:1238-1244.

Petri, W. A Jr., Chapman, M. D., Snodgrass, T., Mann, B. J., Broman, J. y Ravdin, J. I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* . *J. Biol. Chem*. 246:3007-3011.

Piette, J., Hirai, S. y Yaniv, M. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:3401-3405.

Presutti, C., Caifre, S.-A. y Bozzoni, I. (1991). the ribosomal protein L2 in *Saccharomyces cerevisiae* controls the level of accumulation of its own mRNA. *EMBO. J*. 10: 2215-2221.

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell. Biol*. 5:85.

Raué, H. A. y Planta, R. J. (1991). Ribosome biogenesis in yeast. In: progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 41. Academic Press. New York, pp. 89-129.

- Rauscher III, F. J., Voulalas, P. J., Franza, B. R. Jr. y Curran, T. (1988^a). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes Dev.* 2: 1687-1699.
- Rauscher III, F. J., Cohen, R. D., Curran, T., Bos, T. J., Vogt, P. K., Bohmann, D., Tjian, R. y Franza, B. R. Jr. (1988^b). Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science.* 240: 1010-1016.
- Ravdin, J. I., Murphy, C. F., Guerrant, R. L. y Long-Krug, S. A. (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 152: 542-546.
- Ravdin, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica* : studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8:247.
- Ravdin, J. I. (1988). Pathogenesis of amebiasis. An overreview. In: J. I. Ravdin (Ed), *Amebiasis-human infection by Entamoeba histolytica* , John Wiley & Sons Inc. New York, pp 166.
- Ravdin, J. I. (1995). Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 20:1453-1466.
- Reed, S. L. y Col. (1989). Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2772-2777.
- Reed, S. L., Flores, B. M., Batzer, M. A. y Col. (1992). Molecular and cellular characterization of the 29 kilodaltons peripheral membrane protein of *Entamoeba histolytica* – differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Infect. Immun.* 60:542-549.
- Reed, S. L. y Col. (1993). Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica* : pathogenic strains a unique cysteine proteinase gene. *J. Clin. Invest.* 91:1532-1540.
- Reeves, R. E. (1984). Metabolims of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. 1903. *Adv. Parasitol.* 23:105-142.
- Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1989). *Nucleic Acids Res.* 17: 3757-3762.
- Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Chartier, Y. y Meyer, Y. (1993). Nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a homolog to a suppressor of Wilms' Tumor. *Plant. Physiol.* 102: 329-330.
- Rodriguez, M. A., Hernández, F., Santos, L., Valdez, A. y Orozco, E. (1989). *Entamoeba histolytica* : molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37: 87-100.
- Rosales- Encina, J. L., Meza, I., López de león, A., Talamás- Rohana, P. y Rojkind, M. (1987). Isolation of a 220 kDa protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica* . *J. Infect. Dis.* 156: 790-794.

- Ryseck, R. P. y Bravo, R. (1991). *Oncogene*. 6: 533-542.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R. (1977). DNA Sequencing with Chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Scholze, H. y Werries, E. (1986). Cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* . I. Partial purification and action on different enzymes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18:103-112.
- Scholze, H. y Tannich, E. (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica* . *Methods in Enzymology*. 244:512-522.
- Sollner-Webb, B. y Tower, J. (1986). Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 801-830.
- Sollner-Webb, B. y Mougey, E. B. (1991). News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 16:58-62.
- Steitz, T. A. (1990). *Q. Rev. Biophys.* 23: 205-280.
- Stewart, M. J. y Denell, R. (1993). *Mol. Cell. Biol.* 13: 2524-2535.
- Tasheva, E. S. y roufa, D. J. (1995). Regulation of human RPS14 transcription by intronic antisense RNAs and ribosomal protein S14. *Genes & Development*. 9: 304-316
- Tannich, E., Ebert, F. y Horstmann, R. D. (1991). Primary structure of the 170 kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1849-1853.
- Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R., Horstmann, R. D. (1991). Homologous cysteine proteinase of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* . *J. Biol. Chem.* 266:4798-4803.
- Tannich, E. y Horstmann, R. D. (1992). Codon Usage in pathogenic *Entamoeba histolytica* . *J. Mol. Evol.* 34:272-273.
- Torian, B. E., Lukehart, S. A. y Stamm, W. E. (1987). Use of manoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96 000-dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica* . *J. Infec. Dis.* 156:334-343.
- Toczysky, P. D., Matera, G. A., Ward, C. D. y Steitz, A. J. (1994). The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 3463-3467.
- Turner, R. y Tjian, R. (1989). Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional c-fos—c-jun heterodimers. *Science*. 243: 1689-1694.
- Treviño García- Manzo, N., Escandón- Romero, C., Escobedo- de la peña, J., Hernández-Ramos, J. M. y Fierro- Hernández, H. Amebiasis in the epidemiologic transition in Mexico:

its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of the Social Security. Arch. Med. Res. 1994. 25:393-399.

Tron, T., Yang, M., Dick, F. A., Schmitt, M. E. y Trompower, B. L. (1995). QSR1, an essential yeast gene with a genetic relationship to a subunit of the mitochondrial cytochrome bc1 complex, is homologous to a gene implicated eukaryotic cell differentiation. J. Biol. Chem. 270: 1-10.

Tsutsumi, V., Ramírez- Rosales, A., Lanz-Mendoza, H. y Col. (1992). *Entamoeba histolytica* : erithrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86:170-172.

Tsutsumi, V., Martínez- Palomo, A. y Tanikawa, K. (1992). Scanning electron microscopy of erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica* trophozoites. Arch. Med. Res. 23:173.

Vargas-Villareal, J., Martínez-Rodríguez, H., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B. D., González-Garza, M. T. y Said-Fernández, S. (1995). Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. Parasitol. Res. 81: 320-323.

Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., De Block, M., Bauw, G., Villaroel, R. y Van Montagu, M. (1994). An S18 ribosomal protein gene copy at the *Arabidopsis PLF* locus affects plant development by its specific expression in meristems. EMBO. J. 13: 3378-3388.

Van Ouweland den, A. M., Kioschi, P., Verdijk, M., Taminini, F., Toniolo, D., Poustka, A. y Van Oost, B. A. (1992). Identification and characterization of a new gene in the human Xq28 region. Hum. Mol. Genet. 1: 269-273.

Virlardell, J. y Warner, J. R. (1994). Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. Genes & Development. 8: 211-220.

Vogt, P. K. y Bos, T. J. (1989). The oncogene jun and nuclear signalling. Trends Biochem. Sci. 14: 172-175.

Vogt, P. K. y Bos, T. J. (1990). Jun: oncogene and transcription factor. Adv. Cancer Res. 55: 1-35.

Walsh, J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infec. Dis. 8:228-238.

Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle, S. U., Ruther, U. y Wagner, E. F. (1992). Nature. 360: 741-745.

Warner, J. R. (1971). The Assembly of Ribosomes in Yeast. J. Biol. Chem. 246:447-454.

Watanabe, M., zinn, A. R., Page, D. C. y Nishimoto, T. (1993). Nature Genet. 4: 268-271.

Watson, K. L., Konrad, K. D., Woods, D. F. y Bryant, P. J. (1992). *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 11302-11306.

Wittmann, H. G. (1982). Annu. Rev. Biochem. 51: 155-182.

Wool, I. G. (1993). In the translational apparatus (Nierhaus, K. H., Franceschi, F., Subramanian, A. R., Erdmann, V. A. y Wittmann- Liebold, b., eds). pp. 727-737. plenum press. Corp. New. York.

Wool, I. G. (1995). In group I introns and ribosomal RNA (Schroeder, R. y Green, R., eds). Landes, Austin, (in press).

Wool, I. G. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. TIBS (21): 164-165.

Woolford Jr, J. L. y Warner, J. R. (1991). The ribosome and its synthesis In: Broach, J. R., Pringle, J. R. y Jones, E. W. (eds). The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* : Genome Dynamics, Protein synthesis, and Energetics. Cold. Spring. Harbor. Laboratory Press. Cold. Spring. Harbor, NY, pp. 587-626.

Zasloff, M. (1992). Curr. Opin. Immunol. 4:3-7.

Zinker, S. (1980). P5/P5' The Acidic Ribosomal Phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Acta. 606:76-82.