

10 00562



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

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

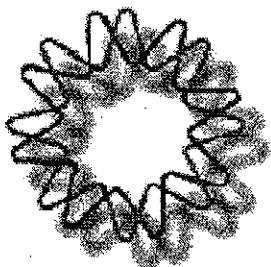
**Inhibición de la expresión de genes de la vía
secretoria de *Entamoeba histolytica* mediante ácidos
peptidonucleicos.**

T E S I S

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

P R E S E N T A

ANDRÉS MARTÍN SARALEGUI AMARO



Cuernavaca, Morelos, Febrero de 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

a mis viejos
Blanca y Mariano

**Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón
Cano, en el Departamento de Reconocimiento Molecular y
Bioestructura del Instituto de Biotecnología U.N.A.M, bajo la
dirección del Dr. Roberto P. Stock Silberman**

**Este trabajo de investigación fue realizado con una beca otorgada por el
Gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores.**

Agradecimientos

Este trabajo hubiera sido muy difícil sin el aporte de:

Alejandro Alagón, por la oportunidad de aprender trabajando a su lado, por la libertad y el apoyo que sabe dar, por su humor y su don de gentes

Roberto Stock, por compartir su experiencia, por su apoyo y compromiso constante, por trabajar codo a codo conmigo, por ser mi amigo.

Alejandro Olvera, por enseñarme a trabajar con amibas, tenerme paciencia y ser un gran compañero.

Ricardo Sánchez, por dar una mano cuando era necesario y por su compañerismo.

Mónica Prud'Homme, por apoyarme siempre y brindarme su amistad.

Lidia Boffa, Gianluca Damonte, Raffaele Nicolai y Carlo Scappola por su cooperación durante las purificaciones de PNA en Génova.

El Dr. Xavier Soberón y la Dra. Susana López, por sus comentarios y sugerencias durante los tutorales.

El Dr. Julio Carrero, el Dr. Eduardo Horjales y el Dr. Mario Zurita, por sus comentarios críticos durante la revisión de esta tesis.

Felipe Olvera, Olegaria Benítez y Ricardo Mondragón, por su apoyo técnico en el laboratorio, y Angélica Linares por su apoyo administrativo.

La cooperación del personal del Bioterio del IBT.

El apoyo de la unidad de Docencia del IBT.

El apoyo económico de los proyectos CONACYT N-27826 y DGAPA-UNAM IN-208400.

Todos mis compañeros de laboratorio y del IBT, que nunca me hicieron sentir fuera de casa.

Indice

Introducción	1
1-<i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1-Amibiasis	1
1.2-Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.3-Genoma	2
1.4-Organización bioquímica y celular	3
1.5- <i>Entamoeba histolytica</i> como eucariota singular	4
1.6-Mecanismos de patogenicidad	4
1.7-Estudios con ARN antisentido en <i>E. histolytica</i>	6
2-Secreción: Generalidades	7
2.1-La vía secretoria en eucariotas	8
2.2-Vía Secretoria de <i>E. histolytica</i>	9
3-PNAs	11
3.1-Análogos de ADN	11
3.2-Propiedades químicas del PNA	12
3.3-Aplicaciones biológicas de los PNAs	13
4-Antecedentes y justificación del proyecto	14
Objetivos	16
Materiales y Métodos	17
1-Materiales	17
1.1-Tampones y soluciones	17
1.2-PNAs	17
1.3-Péptidos	18
1.4-Oligonucleótidos	18
1.5-Células	19
1.6-Medios de cultivo	19

1.7-Vectores	19
1.8-Marcadores de peso molecular	20
1.9-Cómputo	20
1.10-Instrumentos	20
2-Métodos	21
2.1-Síntesis de PNA y péptidos	21
2.2-Purificación y caracterización de PNA	21
2.3-Cultivo de células	21
2.4-Obtención de células competentes	22
2.5-Reacciones de PCR	22
2.6-Clonación	22
2.7-Transformación	22
2.8-Extracción de ADN plasmídico	23
2.9-Secuenciación	23
2.10-Cuantificación	23
2.11-Electroforesis de ADN	23
2.12-Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	24
2.13-Tratamiento enzimático del ADN	24
2.14-Electroforesis de proteínas	24
2.15-Transferencia de proteínas a membrana	25
2.16-Western blots	25
2.17-Expresión de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	26
2.18-Purificación de las proteínas recombinantes	26
2.19-Obtención de anticuerpos policlonales	26
2.20-Preparación de los lisados de <i>E. histolytica</i>	28
2.21-Medición de la proliferación de trofozoítos	28
2.22-Inmunocitoquímicas	29
2.23-Ensayos de citotoxicidad	29
Resultados	30

-Reacción de PCR para CP5 y amibaporo	30
-Clonado de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR	30
-Conjugación a BSA de los péptidos sintetizados	32
-Inoculación de conejos y obtención y purificación de anticuerpos contra los péptidos pCP5 y pAp	33
-Efecto de los PNAs sobre la proliferación de trofozoítos	34
-Síntesis de un PNA contra el 5' UTR del ARNm de la proteína Rab8	36
-Efecto de los PNAs sobre la expresión de proteínas	37
-Evaluación morfológica del efecto de los diferentes PNAs sobre la distribución subcelular de CP5 mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal.	40
-Efecto de los PNAs sobre la citotoxicidad	44
Discusión y conclusiones	45
-Elección de los blancos	46
-Efecto del PNA sobre la proliferación de trofozoítos	46
-Efecto de los PNA en la expresión de proteína	47
-Relación entre proliferación-nivel de proteína	48
-Inmunocitoquímicas y citotoxicidad de trofozoítos tratados con PNA	49
Referencias	51
ANEXO	55

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AG	Aparato de Golgi
Amp	Ampicilina
Ap	Fosfatasa Alcalina
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina Trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato
BSA	Seroalbumina bovina
β -ME	2-Mercaptoetanol
CAPS	Acido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
Da	Daltones
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Optica
E64	N-(N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil)-agmatina
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Unido a Enzima
EtOH	Etanol
g	Gramos
h	Horas
HATU	O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
IP	Ioduro de Propidio
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
M	Molar
MeOH	Metanol

mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
NBT	Azul de Tetrazolio
nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN Polimerasa
PMSF	Fluoruro de Fenilmetil Sulfonilo
PNA	Acido peptidonucleico
RE	Retículo Endoplasmático
RPM	Revoluciones por Minuto
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SPDP	N-Succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato
TA	Temperatura Ambiente
TEMED	N-N-N'-N'-Tetrametil Etilendiamina
Tm	Temperatura de Desnaturalización
Tris	Trishidroximetil Aminometano
Tween20	Monolaurato de Sorbitol Polioxietileno (20)
Uv	Luz Ultravioleta

Resumen

Los ácidos péptido nucleicos (PNA) son análogos sintéticos de oligonucleótidos de ADN y ARN. Poseen un esqueleto pseudopéptidico formado por monómeros de N-(2-aminoetil)glicina al cual se unen las nucleobases, que hace que los PNAs sean aquirales, sin carga y levemente hidrofóbicos. Se ha demostrado la capacidad de inhibición de los PNAs tanto sobre la transcripción como sobre la traducción, mediado ya sea por un desplazamiento e invasión del dúplex de ADN, como por un impedimento estérico sobre el ensamblaje/desplazamiento de los ribosomas. En el presente trabajo se logró la inhibición de la expresión de genes de la vía secretoria de *Entamoeba histolytica* mediante PNAs. Los genes blanco fueron ERD2, Sec61 y Rab8, cuyos homólogos en otros eucariotas son esenciales para el funcionamiento de la vía secretoria. La inhibición se evaluó mediante western blots cuantitativos, y se analizaron fenotipos como proliferación, distribución membranal de marcadores y citotoxicidad. Este constituye el primer estudio de genética inversa realizado sobre la vía secretoria de *E. histolytica*.

Introducción

1-*Entamoeba histolytica*

1.1-Amibiasis

E. histolytica es un protozoo parásito que vive en el lumen del intestino grueso humano. Es el causante de la amibiasis, enfermedad cuyas manifestaciones clínicas abarcan desde la disentería y la diarrea (cuando el parásito invade la mucosa intestinal), hasta abscesos hepáticos potencialmente fatales (Sepúlveda y Martínez-Palomo, 1984; Romero, 1993). Solo el 10% de los casos son sintomáticos. La distribución del parásito es mundial, pero su prevalencia es mayor en climas templados y en aquellos países del tercer mundo donde las condiciones sanitarias son inadecuadas (Martínez-Palomo y Espinoza-Castellano, 1988). Anualmente se producen medio millón de infecciones en el mundo y más de 40,000 casos de muertes debidas a la amibiasis, lo cual la ubica como la tercera causa de muerte por parasitosis, precedida por la malaria y la esquistosomiasis (Walsh, 1986). Actualmente se cree que 50 millones de personas están infectadas, un millón de las cuales se encuentra en México, donde se reportan 1000 muertes anuales debidas a amibiasis (Caballero-Salcedo *et al*, 1994).

1.2-Ciclo de vida de *E. histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* no ha sido estudiado en humanos, pero se puede inferir por estudios realizados en monos (Dobell, 1928). Morfológicamente se pueden distinguir dos estados: el quiste (forma infectiva) y el trofozoíto (forma invasiva), aunque se proponen dos formas más: el metaquiste (estadio intermedio entre quiste y trofozoíto) y el prequiste (intermedio entre trofozoíto y quiste) (Fig. 1). El quiste es de forma esférica, mide entre 8 y 20 μm , y puede poseer en su interior de 1 a 4 núcleos (forma madura). El quiste maduro es ingerido, pasa por el estómago y desenquista en el intestino delgado dando lugar a un trofozoíto tetranucleado. El quiste es resistente a los jugos gástricos y a los agentes físicos (lo que le permite permanecer meses infectivo) debido a la gruesa (150 nm) capa de quitina que lo envuelve (Martínez-Palomo, 1993). En el intestino la amiba

realiza un ciclo de replicación nuclear y tres de división celular, dando origen a ocho trofozoítos binucleados. El trofozoíto es la forma dinámica y metabólicamente activa, puede medir entre 10 y 40 μm , y según observaciones realizadas en el laboratorio puede contener de 1 a 8 núcleos. Estos llegan al colon donde se establecen, y ocasionalmente invaden la mucosa intestinal provocando lesiones ulcerativas, alcanzando el torrente sanguíneo desde donde pueden acceder a otros órganos susceptibles de invasión (hígado, pulmón, cerebro). Mientras permanece en el colon, el trofozoíto puede seguir dividiéndose por fisión binaria o, estimulado por factores desconocidos, enquistarse. Durante el proceso de enquistamiento el prequiste sufre dos divisiones nucleares sin división celular, produciendo una célula tetranucleada y con pared quitinosa que es excretada con las heces.

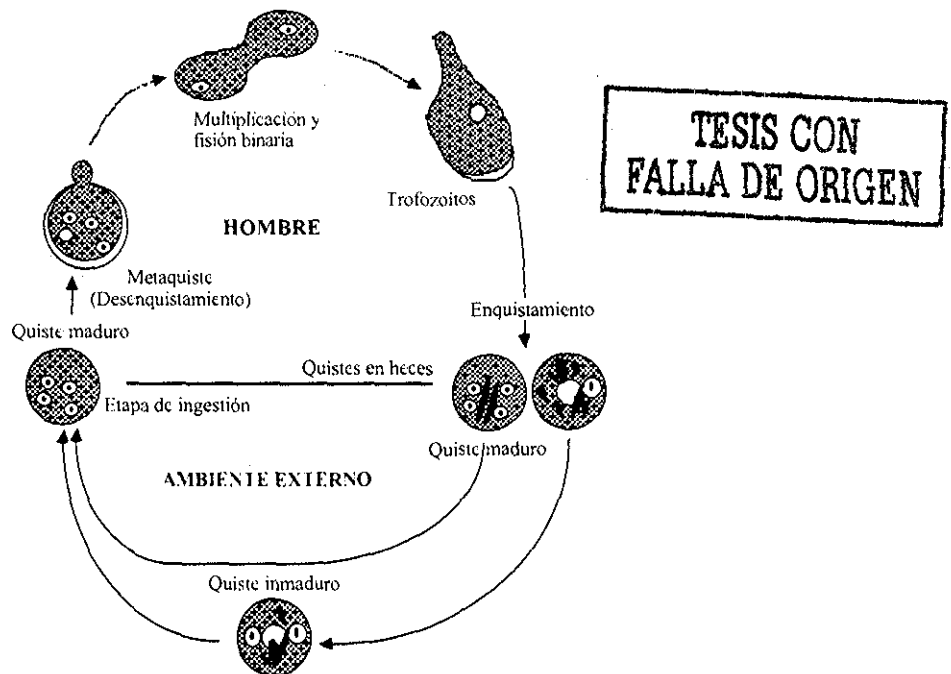


Fig 1: Esquematación del ciclo de vida de *E. histolytica*

1.3-Genoma

El genoma de *E. histolytica* contiene, según diferentes cálculos, de 2.2 a 3.7×10^8 Kb (Bhattacharya *et al.*, 2000) y está organizado en 31-35 cromosomas de entre 0.3 y 3.3 Mb (Willhoeft *et al.*, 2000), aunque estos cálculos aun mantienen cierta duda debido a que la ploidía es incierta. La cromatina se organiza en partículas similares a nucleosomas

(Torres-Guerrero, 1991). El contenido global de G+C es de 22%, mientras que en secuencias codificantes es de 33%, con una preferencia de A+T en la tercera posición del codón del 82% (Tannich *et al* , 1992). Las regiones intergénicas y las regiones 5' y 3' no traducidas de los ARNm son relativamente cortas (Petter *et al* , 1992, Bruchhaus *et al* , 1993). La mayoría de los genes carecen de intrones y, en los que tienen, éstos son de menos de 100 pb (Bhattacharya *et al* , 2000). Se ha observado una expresión génica que se asemeja a la transcripción monocistrónica de eucariotes recientes, así como elementos reguladores como las cajas TATA y un spliceosoma funcional (Mitanda *et al*., 1996). En cada célula existen aproximadamente 200 copias de ADN extracromosomal circular de 24.5 Kb, que se replica autónomamente y que codifica para los ARN ribosomales (Bhattacharya *et al*., 1989, Hubber *et al*.,1989).

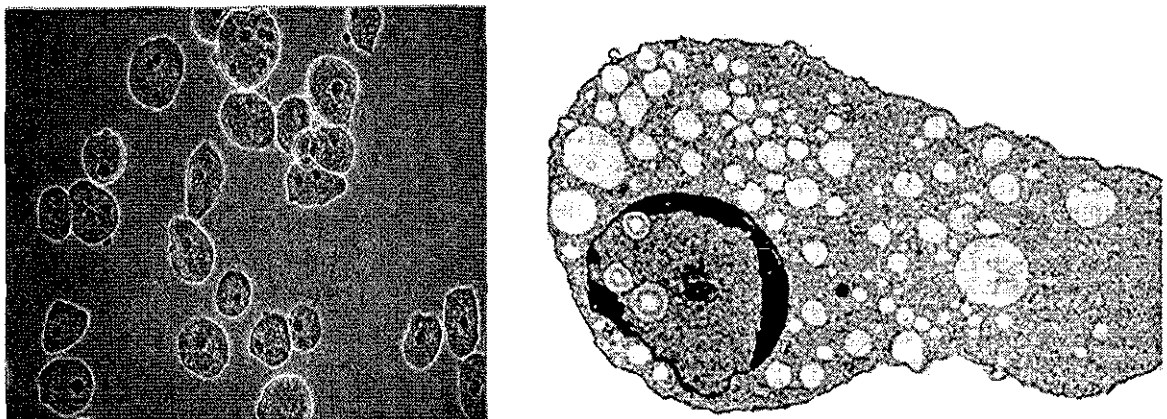


Fig 2: Trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. A la izquierda un campo de trofozoitos en cultivo vistos por contraste de fases. Nótese la heterogeneidad en cuanto a tamaño, forma y cantidad de núcleos. A la derecha se observa una imagen por microscopía electrónica, donde se aprecia la gran cantidad de vesículas citoplasmáticas.

1.4-Organización bioquímica y celular

Entamoeba histolytica es un eucariota unicelular estructuralmente simple. Su citoplasma contiene núcleos y numerosas vesículas, sin ningún otro organelo morfológicamente reconocible (Fig. 2). El trofozoito es una célula dinámica, que realiza continuos movimientos citoplasmáticos y de membrana, con formación de pseudópodos, uroide y

filopodia. También es endocíticamente activo, existiendo evidencia de fagocitosis y pinocitosis. Su reproducción es asexual, por fisión binaria. No se han observado ribosomas libres o unidos a membrana, sino en arreglos helicoidales asociados a vesículas (Martínez-Palomo, 1993). Metabólicamente, *E. histolytica* es un microaerófilico/anaerobio que obtiene energía a partir de glucosa, y en menor medida de galactosa. Carece de citocromo, ciclo del ácido tricarbóxico, vía biosintética del glutatión y regulación alostérica de la glucólisis. La glucosa se almacena en forma de glucógeno, y algunas enzimas glucolíticas pueden usar pirofosfato como fuente de energía (Saavedra-Lira *et al.*, 1996).

1.5- *Entamoeba histolytica* como eucariota singular

E. histolytica es un organismo eucariota poco convencional. Su citoplasma carece de la mayoría de las estructuras que se encuentran en eucariotas típicos: citoesqueleto estructurado, mitocondria, peroxisomas y sistemas membranosos como el RE y AG (aunque existen pequeñas estructuras que podrían corresponder a AG (Chávez-Munguía *et al.*, 2000). Esto unido a estudios ultraestructurales que no detectaron ribosomas asociados a membranas, hace que *Entamoeba histolytica* carezca aparentemente de las estructuras típicas de síntesis, tráfico y exportación de proteínas de las células eucariotas convencionales. Estas ausencias, junto con las particularidades metabólicas citadas anteriormente, hacen que la amiba sea considerada como una divergencia temprana de la rama de los eucariotas, previa al evento de adquisición de la mitocondria. Sin embargo, árboles filogenéticos realizados en base a secuencias de ARN ribosomal sitúan a *E. histolytica* en una ramificación más reciente (Cavalier-Smith, 1993). También han sido identificadas proteínas amibianas homólogas a proteínas que en otras células eucariotas se encuentran en la mitocondria, lo que ha llevado a formular la hipótesis de la pérdida secundaria de la mitocondria como producto de la adaptación al parasitismo entérico y la anaerobiosis (Clark, 1995).

1.6-Mecanismos de patogenicidad

El trofozoito de *E. histolytica* puede vivir como comensal en el colon humano produciendo una infección asintomática, que por factores aún poco conocidos pueden

desencadenar la infección patogénica y el proceso de invasión del epitelio, causando úlceras, disentería y eventualmente amibiasis extraintestinal (Gilchrist, 1999). En la invasión del trofozoíto a la mucosa se pueden distinguir varias etapas: adhesión a la mucosa intestinal, muerte celular por contacto, disrupción de la pared intestinal y transporte a través del torrente sanguíneo (Das *et al.*, 1999). Varias proteínas amibianas están implicadas en la patogénesis (denominadas factores de virulencia), incluyendo proteínas formadoras de poro, de adherencia a la superficie celular y proteínas con actividad enzimática (Gilchrist y Petri, 1999). A continuación se detallan algunos factores de virulencia identificados en *E. histolytica*.

Factores de adherencia: la adhesión del trofozoíto a la célula blanco es necesaria para que comience el proceso lítico. Esta depende principalmente de la lectina Gal/NAc, que es una glicoproteína de superficie con afinidad por la galactosa y la N-acetilgalactosamina (Chadee, 1987). La lectina Gal/NAc consiste en una cadena pesada de 170 kDa unida mediante puentes disulfuro con una cadena ligera de 35 kDa (Petri *et al.* 1989). Otras moléculas involucradas en adherencia son la adhesina EhADH112 (García-Rivera, 1999), la lectina de 220 kDa (Rosales-Encina *et al.*, 1989) y el fosfolipoglicano de superficie (Stanley *et al.*, 1992).

Péptidos formadores de poro: El amibaporo es una proteína formadora de poro que se secreta e inserta inespecíficamente en membranas celulares formando canales iónicos al oligomerizar. Es el principal candidato a responsable del efecto citolítico (Leippe *et al.*, 1991 y 1995). La inhibición de su expresión en 60% lleva a una caída casi total de la citotoxicidad del trofozoíto (Bracha *et al.*, 1999).

Enzimas: Se han identificado varias enzimas involucradas en eventos líticos como la colagenasa (Muñoz *et al.*, 1984), fosfolipasa A (Ravdin *et al.*, 1985) y proteasas de cisteínas (CP). Estas son un grupo de proteínas que degradan la matriz extracelular y median la destrucción de tejidos (Perez-Monfort *et al.*, 1987). CP5 es la más abundante de las proteasas de cisteínas. (Jacobs *et al.*, 1998). Se encuentra asociada a membrana y constituye el 40% de las CP de amiba, siendo la única de las CP ausente en la amiba no patogénica *E. dispar* (Bruchhaus *et al.*, 1996).

1.7-Estudios con ARN antisentido en *E. histolytica*

Regular o eliminar la expresión de productos génicos ha sido fundamental para comprender el papel funcional que juegan en la célula. En *E. histolytica* no es posible aplicar muchas de las técnicas genéticas estándar, ya que no posee un ciclo sexual conocido y su genoma es de ploidía compleja. Aún no se han desarrollado métodos de recombinación homóloga para amibas, por lo que las únicas formas de estudiar funciones génicas son la expresión de genes mutantes y la inactivación de genes por ARN antisentido (Petri *et al*, 1999). La transfección estable de amibas con plásmidos codificantes para ARN antisentido ha sido usada como una herramienta eficiente para la inhibición de la expresión de genes de interés. El desarrollo de técnicas de transfección estable, y la posibilidad de controlar la transcripción por medio del promotor del gen de la proteína ribosomal RP-L21, hicieron posible el uso de esta técnica en amibas (Alon *et al*, 1997). Los ensayos realizados hasta ahora en *E. histolytica* han sido dirigidos a factores de virulencia. Con la proteasa de cisteína 5 (CP5) se logró una caída de la actividad asociada del 90% (Ankri *et al*, 1998); en el caso del amibaporo y de la lectina Gal/NAc la inhibición de la expresión fue del 60% (Bracha *et al*, 1999) (Ankri *et al*, 1999). Debido al éxito parcial de esta técnica, se ha intentado encontrar otras aproximaciones al problema de la inhibición de la expresión génica en *E. histolytica*. Entre las aproximaciones que aún no se han intentado se encuentra la interferencia por ARN doble cadena (RNAi), que ha obtenido buenos resultados en otros eucariotes. En el presente trabajo se procuró inhibir la expresión génica utilizando análogos de ADN.

2-Secreción: Generalidades

En procariotas y eucariotas existe la necesidad de situar las proteínas sintetizadas en el sitio indicado para que ejerzan su función. Para esto la célula ha desarrollado procesos especializados encargados de mantener la localización subcelular adecuada de cada proteína. En procariotas, específicamente en *E. coli*, las proteínas se sintetizan en el citosol y pueden permanecer en él o, mediante señales peptídicas adecuadas, ser insertadas o trasladadas a través de la membrana plasmática (Rothblatt *et al.*, 1994). En el caso de los eucariotas, la mayor complejidad es contrarrestada por la compartimentalización. En las células eucariotas, una membrana con permeabilidad selectiva organiza y separa las reacciones bioquímicas de un organelo, generando compartimientos morfológicamente distintos y funcionalmente especializados. Las membranas de los organelos, además de contener transportadores responsables de la importación y exportación de metabolitos, poseen los mecanismos para importar e incorporar las proteínas que hacen único a cada compartimiento (Mellman y Warren, 2000). Para el mantenimiento de las funciones y estructuras celulares, las proteínas y lípidos deben ser transportados a su destino final por medio del sistema endomembranoso. Dos modelos existen actualmente para explicar este transporte, el de transporte vesicular y el de maduración de cisternas. El modelo de transporte vesicular propone que el transporte de material entre compartimientos es mediante vesículas, direccionado desde el compartimiento de partida hacia el receptor (Palade, 1975) (Fig. 3). Esta direccionalidad viene dada por la diferente composición bioquímica de las membranas de dichos compartimientos y por una serie de proteínas "etiqueta" presentes en la membrana vesicular. Estas incluyen las proteínas SNARE y Rab (GTPasas de bajo peso molecular) (Soogard *et al.*, 1994). El modelo de maduración de cisternas propone que las proteínas son transportadas en el lumen del compartimiento y es éste el que madura secuencialmente, hasta alcanzar su destino final (Mironov *et al.*, 1997). En la sección siguiente se revisará la vía secretoria según el modelo de transporte vesicular, el más aceptado hasta el momento.

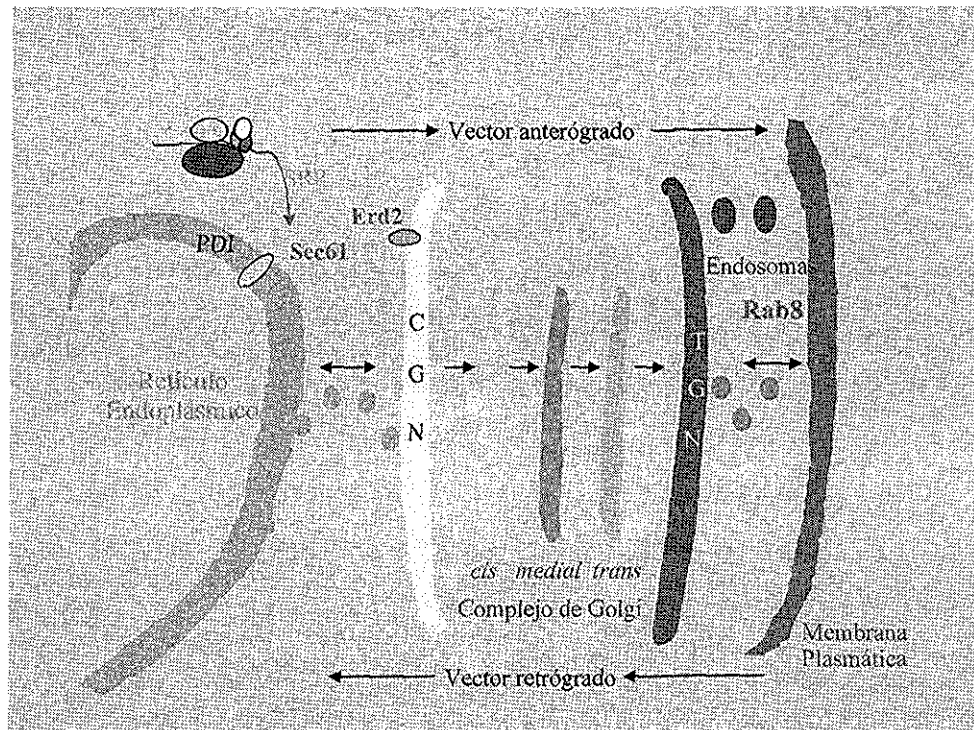


Fig. 3: Esquematización de una vía secretoria eucariota típica. Se encuentran señaladas las ubicaciones de las proteínas mencionadas en esta tesis.

2.1-La vía secretoria en eucariotas

Al ensamblarse el ribosoma sobre el ARNm en el citoplasma y comenzar la traducción, el péptido nascente puede seguir dos diferentes caminos. O bien continúa sintetizándose en el citosol, o bien ese péptido posee ciertas características (hidrofobicidad, estructura terciaria, carga, etc.) que lo hacen un blanco reconocible por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). La SRP es un complejo ribonucleoproteico que al reconocer el péptido emergente del ribosoma, detiene la traducción y transporta el complejo ribosoma-polipéptido-ARN hacia la membrana del RE. En esta membrana se encuentra el receptor para la SRP, que al interaccionar con su blanco disocia a la SRP del complejo y posiciona el péptido nascente sobre el canal de traslocación, para que se reinicie la traducción. El canal de traslocación es un complejo de proteínas transmembranales que provee un ambiente acuoso para que el péptido atraviese la membrana. La maquinaria de traslocación está compuesta por varias proteínas, entre las cuales se destacan el receptor de SRP, las proteínas TRAM, y las componentes del complejo Sec61: Sec61 α , β y γ . Las proteínas de membrana son insertadas en ésta por la

misma maquinaria de traslocación por un mecanismo poco conocido (Johnson y van Waes, 1999). Si la proteína es soluble, mientras es trasladada al lumen del RE es modificada por varias proteínas residentes. Una peptidasa elimina el péptido señal, chaperonas favorecen el plegamiento correcto, se forman puentes disulfuro con la asistencia de disulfuro isomerasas y el complejo oligosacaril transferasa glicosila los residuos adecuados. Si la proteína no posee señales de residencia en el RE, continúa su camino hacia el complejo de Golgi en vesículas cubiertas por el complejo COPII (Mellman y Warren, 2000). Al fusionarse las vesículas provenientes del RE con la membrana del *cis*-Golgi y liberar su contenido en el lumen de éste, las modificaciones a las proteínas continúan. En su paso por el complejo de Golgi, las proteínas pueden sufrir O-glicosilación y rearreglo de azúcares, sulfatación, fosforilación y degradación. Las proteínas residentes del lumen del RE que poseen el tetrapéptido señal KDEL, al llegar al *cis*-Golgi son reconocidas por el receptor ERD2, seleccionadas, concentradas y empaquetadas en vesículas cubiertas por el complejo COPI. Estas vesículas son conducidas por transporte retrógrado de regreso al RE (Pelham, 1996). Las proteínas secretorias y de membrana destinadas a salir del Golgi son seleccionadas y concentradas en las cisternas del *trans*-Golgi. Allí son empaquetadas en vesículas cubiertas de clatrina y transportadas a la vía endosomal o a la membrana plasmática. El direccionamiento correcto de estas vesículas a su destino final, está asociado a la presencia de proteínas SNARE en la superficie de la vesícula (v-SNARE) y en la membrana del organelo blanco (t-SNARE). Estas proteínas son receptores de factores solubles citosólicos necesarios para el anclaje y fusión de la vesícula en la membrana blanco, de los cuales el más caracterizado es la familia de proteínas Rab

2.2-Vía Secretoria de *E. histolytica*

A lo largo de la segunda mitad del siglo pasado se completó un exhaustivo estudio ultraestructural de *E. histolytica*, que no arrojó evidencia de que existan en el trofozoíto citoesqueleto estructurado, RE o complejo de Golgi. El citoplasma está abundantemente poblado de vesículas y vacuolas sin una diferenciación funcional aparente. Sin embargo, existen evidencias de que las funciones de la vía secretoria son realizadas en el trofozoíto. *E. histolytica* secreta activamente proteínas (por ejemplo factores de virulencia) y

proteínas de membrana plasmática son selectivamente dirigidas hacia su destino (por ejemplo la lectina Gal/Nac). Dicha lectina además presenta el corte proteolítico de su péptido señal, como sucedería en la traslocación al RE en eucariotas típicos. Existe evidencia de que *E. histolytica* también realiza O- y N-glicosilación (Sánchez-López *et al.*, 2000). Tomando en cuenta esta evidencia se ha procurado hallar proteínas homólogas a las que participan en la vía secretoria en otros organismos. En nuestro laboratorio se han descrito varios genes de *E. histolytica* involucrados en secreción: Srp54, que codifica en células eucariotas para una proteína del complejo SRP, encargado de la conducción de las proteínas nacientes hacia y a través de la membrana del RE (Ramos *et al.*, 1997); STT3, codificante en células eucariotas para una de las subunidades del complejo oligosacaril transferasa presente en RE y responsable de la primera etapa del proceso de glicosilación de proteínas (Gutiérrez *et al.*, 2000); PDI, que codifica en eucariotas para una proteína-disulfuro isomerasa, una enzima de lumen de RE que cataliza la formación de puentes disulfuro en proteínas que circulan por este compartimiento celular (Ramos y Alagón, 2000); Sec61 α , que en eucariotas codifica para una proteína integrante del componente central del complejo del canal de traslocación, encargado de transportar el péptido naciente a través de la membrana del RE (Sánchez-López *et al.*, 2000); Erd2, que codifica en eucariotas para el receptor de secuencias KDEL. Esta secuencia determina la localización de proteínas en el lumen del RE. Las proteínas que poseen esa señal son reconocidas por Erd2 en el cis-Golgi, y el complejo viaja de regreso al RE por intermedio de vesículas, que al fusionarse con la membrana del RE liberan su contenido en él (Sanchez-Lopez *et al.*, 1998); Rab8, codificante en mamíferos para una proteína de unión al GTP, involucrada en tráfico vesicular del trans-Golgi hacia la membrana basolateral (Juárez *et al.*, 2000). A partir de estos datos se vislumbra la presencia de una vía secretoria activa en *E. histolytica*, aunque aún no se observado su correlato estructural. Sin embargo la inferencia de homologías funcionales a partir de homologías de secuencia de proteínas debe corroborarse con una caracterización funcional que actualmente se está llevando a cabo.

3-PNAs

La estrategia antisentido para el bloqueo de la expresión génica se basa en la interacción por apareamiento de bases de un oligonucleótido (o un análogo) de secuencia complementaria con el ARNm blanco. En sistemas libres de células, oligonucleótidos de ARN y ADN pueden ejercer efecto antisentido (Uhlmann y Peyman, 1990). Sin embargo, los oligonucleótidos de ARN y ADN antisentido se degradan rápidamente *in vivo* e *in vitro*, lo que ha llevado al desarrollo de estrategias para aumentar la estabilidad y biodisponibilidad de éstos. Una de las aproximaciones fue el diseño de análogos de ácidos nucleicos biológicamente estables (resistentes a nucleasas) que mantuvieran las características de hibridación a ARN del ADN natural y que pudieran internalizarse eficientemente en células.

3.1-Análogos de ADN

Las modificaciones generadas en los análogos de ADN tuvieron hasta ahora dos blancos claves: el azúcar (ribosa) o el enlace fosfodiéster. Entre los análogos con modificaciones en el grupo fosfato se incluyen: fosfarimidatos, fosforoditioatos, fosforotriéteres, boranofosfatos y los más estudiados hasta la fecha que son los metilfosfonatos y fosforotioatos. Aunque algunos de estos compuestos conservan las propiedades de hibridación con ADN, la formación de híbridos y el apareamiento de bases están alterados. También se ha propuesto sustituir el esqueleto de ribosas por otros compuestos como hexosas y derivados morfolínicos, seguidos por una larga lista que incluye alcanos, éteres, tioéteres, aminas, cetonas, formacetales, tioformacetales, amidas, carbamatos, ureas, hidroxilaminas, sulfamatos, sulfamidas, sulfonas, glicinamidas y otros. Sólo unos pocos lograron imitar satisfactoriamente la geometría del enlace fosfodiéster (Nielsen, 1995).

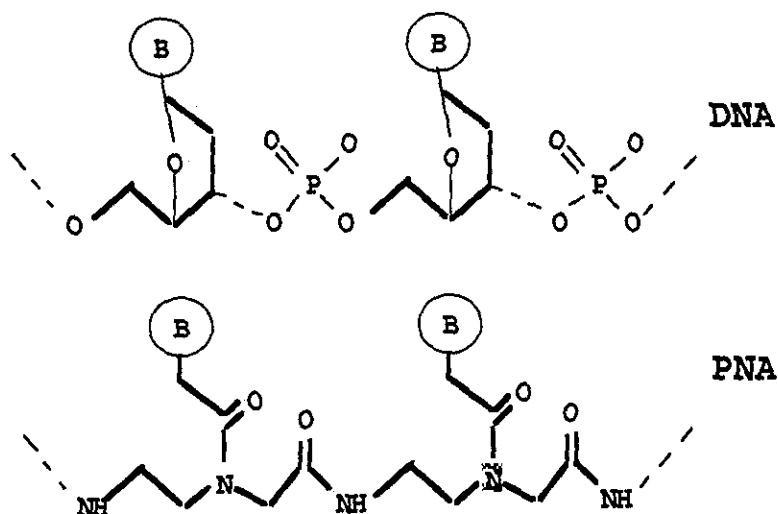


Fig 4: Estructura química del PNA en comparación con la del ADN

3.2-Propiedades químicas del PNA

Teniendo en cuenta algunas reglas empíricas obtenidas a partir de la investigación con los análogos antes descritos, y la modelación por computadora de un esqueleto con la geometría adecuada, se propuso en 1991 la síntesis del ácido péptido nucleico o PNA (Nielsen *et al.*, 1991). Para el diseño se consideró que la distancia óptima entre base y base debía ser la misma que en el DNA (6 enlaces) y que el número de enlaces óptimo entre la base y el esqueleto debía ser 2 o 3. Los resultados mostraron que el esqueleto de N-(2-aminoetil)glicina unido a la base por un grupo metilencarbonílico podía ser el adecuado (Fig 4). Además de ser homomorfo con el esqueleto de ADN y tener gran flexibilidad conformacional, este esqueleto permitía aprovechar la versatilidad de la síntesis de péptidos (Hyrup y Nielsen, 1996). Dicho esqueleto pseudopéptidico es acíclico, aquiral, sin carga y levemente hidrofóbico. La neutralidad de su esqueleto le confiere al PNA la propiedad de unirse a ADN complementario con mayor afinidad (50-100 veces) que el dúplex ADN-ADN a fuerza iónica media y baja. Para un decámero, por ejemplo, la T_m del híbrido PNA-PNA es de 67°C, la del híbrido PNA-ADN es de 51°C y la del dúplex ADN-ADN es de 33.5°C, lo que da un incremento medio por par de bases de 1-1.5°C de la T_m del dúplex PNA-PNA con respecto al ADN-ADN (Wittun *et al.*, 1994). Además el PNA presenta una mayor especificidad de secuencia que el ADN, dado que una base desapareada en un híbrido PNA-ADN produce un descenso en la estabilidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

térmica mayor que en el caso de un dúplex ADN-ADN. En la interacción con ARN, se ha determinado que el híbrido PNA-ARN adopta la estructura de doble hélice dextrógira, con apareamiento de bases tipo Watson y Crick, muy similar a la forma A de los dúplex ARN-ARN (Brown *et al.*, 1994). En el presente, la síntesis química de PNA se lleva a cabo por medio de métodos análogos a aquellos utilizados en la síntesis de péptidos, encontrándose en el mercado monómeros para síntesis química vía t-Boc y F-moc.

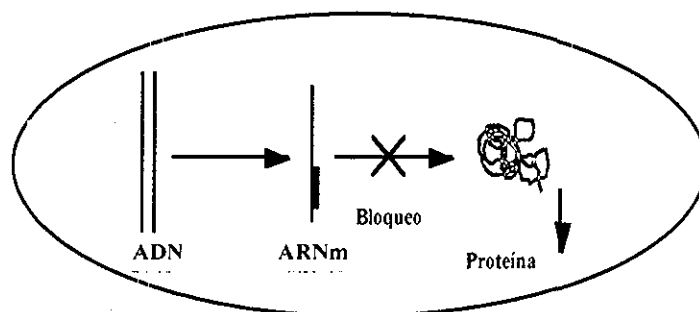


Fig 5: Esquematación del bloqueo producido por los oligonucleótidos o análogos antisentido

3.3-Aplicaciones biológicas de los PNAs

La alta afinidad, especificidad y estabilidad *in vivo* de los PNA, han despertado un gran interés en su posible utilización como agentes antisentido (Fig 5). Además los PNAs no presentan unión a proteínas séricas o debris celular, una ventaja sobre otros candidatos a agentes antisentido. Otra ventaja que presentan los PNA sobre sus análogos naturales es que éstos, al ser utilizados en sistemas celulares, no son reconocidos por nucleasas ni proteasas, lo que aumenta considerablemente su tiempo de vida media y su biodisponibilidad.

En varios estudios realizados *in vitro* en sistemas libres de células, se ha demostrado la capacidad de inhibición de PNA sobre la traducción por un impedimento estérico sobre el desplazamiento de los ribosomas, debido a la formación del dúplex en la región de iniciación de la traducción (AUG), así como la inhibición de la transcripción mediada por un desplazamiento e invasión del dúplex de ADN formando complejos de triple cadena altamente estables capaces de detener el desplazamiento de la RNA polimerasa (Knudsen y Nielsen, 1996). Al ser introducidos en células por medio de microinyección o por permeabilidad membranal, inhiben efectiva y selectivamente la transcripción del ADN o la traducción de mRNA complementarios. Cuando se han utilizado cepas de *E coli*

permeables, se ha observado que concentraciones micromolares de PNA son suficientes para provocar un efecto específico antisentido (Good y Nielsen, 1998a y 1998b). También se ha observado que PNAs unidos a secuencias de localización nuclear (NLS), son capaces de penetrar al núcleo de células tumorales de mamífero en cultivo e inhibir específicamente la transcripción del gen c-myc (Cutrona, 2000).

4-Antecedentes y justificación del proyecto

Tomando el gen SRP54 como modelo se han realizado estudios de permeabilidad de *E. histolytica* a oligómeros de PNA. En el laboratorio se ha observado que las células de *E. histolytica* son permeables a oligómeros de PNAs no modificados de longitudes de entre 13 y 20 residuos. Así también se logró una disminución de la expresión del gene SRP54 (aproximadamente 50%, medido por Western blot cuantitativo) cuando se utilizó un 20mero dirigido contra los primeros 20 nucleótidos codificantes del mRNA. Esta disminución de la expresión del gene SRP54 es específica y se ha asociado a un decremento en la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente (Olvera A, Tesis de Maestría, 1999). Un trabajo similar se ha realizado en el laboratorio al inhibir específicamente la enzima neomicín-fósforotransferasa (NPT) en amibas transfectadas con un plásmido que contiene el gen NPT. La inhibición en la proliferación de trofozoítos cultivados en presencia de neomicina y la inhibición de la actividad de la enzima fueron de alrededor del 70% (Stock *et al.*, 2001).

Actualmente existe una gran cantidad de técnicas de rutina para análisis genético de organismos modelo. No es el caso de otros organismos más complejos y menos caracterizados como *E. histolytica*, donde la utilización de PNA abre nuevos caminos al permitir bloquear la traducción de proteínas específicas y así plantear el análisis de su función. De los aspectos menos conocidos de este parásito es la biología molecular y celular de la vía secretoria, que tiene participación activa en su virulencia. *E. histolytica* no presenta las estructuras típicas de secreción eucariota, pero al presentar genes homólogos a los relacionados con esta función en eucariotas, sugiere la posible presencia de estructuras morfológicamente alternativas capaces de transportar y secretar proteínas.

En este trabajo se plantea la inhibición antisentido de genes cuyos productos están ubicados, por analogía con otros eucariotas, en diferentes etapas de la vía secretoria. El primero de los genes blanco corresponde a la subunidad α de Sec61, el principal componente del canal de traslocación de péptidos nacientes al RE. En levadura se encuentra en la membrana del RE y mutantes termosensibles muestran una acumulación de precursores proteicos en el citoplasma, mientras que la ausencia del gen es letal (Stirling *et al.*, 1992). El segundo gen blanco codifica para ERD2, receptor de membrana que acumula proteínas residentes del RE en el aparato de Golgi para su posterior transporte retrógrado. En levadura se localiza en el aparato de Golgi, y si su expresión se reduce se secretan proteínas residentes del RE, mientras que su delección produce acumulación de membranas y defectos en el transporte de proteínas a través del complejo de Golgi (Semenza *et al.*, 1990). El tercer gen blanco es Rab8, una GTPasa asociada a vesículas post-Golgi. En levadura está localizada en el citoplasma, cerca de la membrana plasmática. Mutantes condicionales muestran un bloqueo en el transporte post-Golgi a la membrana plasmática, con acumulación de vesículas con proteínas de superficie procesadas (Novick *et al.*, 1992). La evaluación de los fenotipos obtenidos por la inhibición de genes en las diferentes etapas de la vía secretoria puede esclarecer algunos aspectos de la patogenicidad del parásito. La patogenicidad de *E. histolytica* está determinada por sus factores de virulencia, en sus variantes de factores de adherencia, formación de poro y actividad proteolítica, y la llegada de estos factores a su lugar de acción (la superficie celular), por analogía con otros organismos, parece estar estrechamente ligada con una vía secretoria activa. Para evaluar el posible efecto de un bloqueo de la vía secretoria en la amiba, se plantea obtener anticuerpos contra el amibaporo A y la proteasa de cisteínas 5 (CP5), lo que permitirá medir el nivel de proteína y su distribución subcelular. Para estos mismos fines se cuenta con anticuerpos monoclonales contra la lectina Gal/Nac (Leroy, 1995).

Objetivos

1-Objetivo general.

Realizar estudios de genética inversa sobre genes que controlan el tráfico de proteínas en *E. histolytica* utilizando ácidos péptido nucleicos específicos antisentido para inhibir la expresión de los genes de la vía secretoria (ERD2, Rab8, Sec61)

2-Objetivos particulares.

-Clonar y expresar los genes de CP5 y amibaporo para la obtención de anticuerpos.

-Llevar a cabo la síntesis química y caracterización de PNAs que correspondan a las secuencias de bases blanco para el bloqueo antisentido de los genes ERD2, Rab8 y Sec61 de *E. histolytica*

-Evaluar la especificidad y el efecto inhibitorio de los PNAs antisentido para los genes ERD2, Rab8 y Sec61 mediante ensayos de Western blot cuantitativo

- Los fenotipos ocasionados por la inhibición de la expresión de estos genes mediante PNAs serán evaluados en términos de:

1-Efectos sobre la viabilidad/proliferación de trofozoítos

2-Potencial citolítico de trofozoítos *in vitro*.

3-Visualización de la localización subcelular de los factores de virulencia amibaporo, CP5 y lectina Gal/NAc.

Materiales y Métodos

1-Materiales

1.1-Tampones y soluciones

- TBSI: Tris HCl 10 mM pH 7, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%
- PBS: NaCl 130 mM, Na₂HPO₄ 70 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, pH 7
- TAE: TrisHCl 40 mM pH 7, Acido Acético 30 mM, EDTA 1 mM
- TANK: Tris 25 mM, glicina 19 mM, SDS 0.1%, pH 8.6
- Solución Stock de acrilamida: Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%
- Tampón Separador para SDS-PAGE: Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8
- Tampón Concentrador para SDS-PAGE: Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8
- Tampón de Carga para SDS-PAGE: glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris 50 mM pH 6.8, β-ME 5%, azul de bromofenol 0.002%
- Tampón de transferencia de proteínas semi-seca: Glicina 39 mM, Tris-Base 48 mM, SDS 0.04%, MeOH 20%, pH 7

1.2-PNAs

PNAs específicos sintetizados.

Para ensayos de inhibición del gen ERD2:

Erd2 Antisentido 17-mer CONH₂ - TAC CAC AAA TTA GAA AA - NH₂

Erd2 Scrambled CONH₂ - CAA TAC ATA AGA TAA CA - NH₂

Para ensayos de inhibición del gen Rab8:

Rab8 Antisentido 17-mer CONH₂ - T TAC AGC CTC TTC CIA A - NH₂

Rab8 Scrambled CONH₂ - A ICC TGA CCC ATC TAT T - NH₂

Rab8-UTR Antisentido CONH₂ - TTT TTT TTG TTT ACA GC - NH₂

Rab8-UTR Scrambled CONH₂ - TTA TTG TTC TTA TTG IC - NH₂

Para ensayos de inhibición del gen Sec61:

Sec61 Antisentido 17-mer CONH₂ - TAC CCT CAC AAA AAG TT - NH₂

Sec61 Scrambled CONH₂ - CCA TTC ACA CAG ATA TA- NH₂

Los PNAs se muestran según la orientación de la síntesis. La hibridación con la secuencia blanco se da en forma antiparalela, de manera que el extremo carboxilo del PNA correspondería con su extremo 3' y el amino con el 5'. La composición de bases de los PNAs scrambled es la misma que la del correspondiente antisentido. Los PNAs fueron diseñados para que su extremo carboxilo hibride con el sitio de inicio de la traducción de los ARNm blanco.

1.3-Péptidos

Los péptidos sintetizados fueron:

p-Ap: NH₂-C I L E N L L T I K G A D K V K D Y I S S-COOH

p-CP5: NH₂-C E I C I Y D K K K V A V-COOH

Las síntesis se llevaron a cabo por química t-Boc.

1.4-Oligonucleótidos

Diseñados a partir de la secuencia del amibaporo:

5'-poro5'-CCC GGATCC AAA GCC ATC GTC TTT GT-3'

3'-Poro3'-CCC AAGCTT TTA GCA AGC ATG AAT CTT-5'

Diseñados a partir de la secuencia de CP5:

5'-CP5 5'-CCC GGATCC TTC ACT GTT CTG TTA TTA-3'

3'-CP5 3'-CCC AAGCTT TTA AGC ATC AGC AAC C-5'

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias publicadas de los respectivos genes, introduciéndose para facilitar el clonado sitios de restricción: BamHI en los extremos 5' y HindIII en los 3'.

1.5-Células

1.5.1-Amibas: Se utilizaron trofozoítos de la cepa HK9 y HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica* cultivados en condiciones axénicas (Diamond *et al*, 1978)

1.5.2-Bacterias: Se utilizó la cepa XL1Blue de *Escherichia coli*.

1.5.3-Mamífero: Se utilizó la línea celular HeLa, proveniente de cáncer cervical humano.

1.6-Medios de cultivo

1.6.1-Para bacterias: Medio LB (Luria-Bertani)

NaCl	1%
Bactotripton	1%
Extracto de levadura	0.5%
Bacto-Agar (para medios sólidos)	1.5%

1.6.2-Para amibas: Medio BI-S-33 (Diamond *et al*, 1978)

Peptona de biotripton	3.65%
Dextrosa	1.21%
NaCl	1.24%
KH ₂ PO ₄	0.07%
K ₂ HPO ₄	0.12%
L-cisteína hidroclicada	0.12%
Acido ascórbico	0.02%
Citrato de amonio férrico	0.006%

Luego de la esterilización se agrega:

Suero de ternera fetal (inactivado)	15%
Vitaminas-Tween 80	3%

1.7-Vectores

pBSSK (pBluescript SK(-), Stratagene) Plásmido de 2958 pb, utilizado para las clonaciones de productos de PCR

pQE30 (QIAGEN). Plásmido de 3.5 kb utilizado para expresión heteróloga en *E. coli*.

pGEX (Smith y Johnson, 1988). Plásmido de 4.9 kb utilizado para expresión heteróloga en *E. coli*.

1.8-Marcadores de peso molecular

Para electroforesis de ADN:

λ HindIII (Boehringer-Manheim). Fragmentos en pb: 23130, 9416, 6557, 4361, 2332, 2027, 564.

Para electroforesis de proteínas:

Marcadores sin tinción (para análisis de perfiles electroforéticos). Proteínas (KDa): miosina (212), MBP- β -galactosidasa (158.2), β -galactosidasa (116.4), fosforilasa B (97.4), BSA (66.4), glutamato deshidrogenasa (55.6), MBP2 (42.7), lactato deshidrogenasa M (36.5), triosafosfato isomerasa (26.6), inhibidor de tripsina (20), lisozima (14.3), aprotinina (6.5), cadena B de la insulina A (3).

Marcadores preteñidos (para Western blot). Proteínas (KDa): MBP- β -galactosidasa (175), MBP-paramiosina (83), glutamato deshidrogenasa (62), aldolasa (47.5), triosafosfato isomerasa (32.5), β -lactoglobulina A (25), lisozima (16.5), aprotinina (6.5).

1.9-Cómputo

Se utilizaron las versiones para Macintosh de los siguientes programas:

Excel (Microsoft)

Kaleida Graph 3.0.1 (Abelbeck Software)

NIH Image 1.62

Gene Construction Kit (Trinity Software)

Photoshop 2.5 (Adobe)

1.10-Instrumentos

Campana de flujo laminar Veco, serie FL-1796.

Incubadora para cultivos celulares Controlled Environment NAPCO, modelo 6200.

Sistema anaeróbico Forma Scientific Inc., modelo 1025.

Microscopio invertido BIOSSTAR American Optical, serie 1820.

Microscopio confocal BIO-RAD, modelo MRC-600 con láser Kr/Ar.

Cytofluor 2300 Millipore.

2-Métodos

2.1-Síntesis de PNA y péptidos

La síntesis se realizó en fase sólida por química tBoc según protocolo publicado previamente (Hyrup *et al.*, 1996). La resina utilizada fue MBHA, que posee grupos 4-metil benzidrilamina. Los acoplamientos se realizaron durante 40 min a 40°C en N-metil pirrolidona (NMP) y se efectuaron con 5 equivalentes de monómero por cada equivalente de la resina y 4.5 eq. de HATU, 7.5 eq. de sim-collidina y 5 eq. de DIPEA. Los lavados se realizaron con NMP. Las desprotecciones se realizaron por 3 min a TA, con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)-mCresol 95:5 respectivamente. La acetilación se realizó por 5 min a 40°C en una mezcla de anhídrido acético-sCollidina-dimetilformamida (DMF) 5:6:89 respectivamente. Se inactivó la acetilación tratando por 2 min a TA con una mezcla de DMF-piperidina 95:5 respectivamente. La neutralización se efectuó con una mezcla de DMF-piridina 95:5 respectivamente. Luego de completados los ciclos se separó el producto de la resina tratando 2 h a TA con una mezcla de TFA:ácido trifluorometanosulfónico:m-cresol 8:2:1 respectivamente. El producto se precipitó en éter frío y luego éste fue evaporado.

2.2-Purificación y caracterización de PNA

La purificación y caracterización de los PNAs fue mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando columnas de Fase Reversa C₁₈, acoplada a espectroscopía de masas, lo que da una exactitud en la determinación de la masa de \pm una uma (Scarfi *et al.*, 1997). Los PNAs utilizados tuvieron una pureza mínima de 90%.

2.3-Cultivo de células

Trofozoítos: Se cultivaron en medio BI-S-33 a 37°.

E. coli: Los cultivos se realizaron a 37° con agitación en medio LB y 20 µg/ml de carbenicilina, y 80 µg/ml de metilicina. Los cultivos se cuantificaron midiendo DO₆₀₀.

HeLa: Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM suplementado con SBF al 10%, en estufa de cultivo a 37° y 5% de CO₂.

2.4-Obtención de células competentes

Se prepararon células de *E. coli* de la cepa XL1 para transformación por el método del CaCl₂ (Morrison, 1979)

2.5-Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en las mismas condiciones para CP5 y el amibaporo. La mezcla de reacción tuvo una concentración de 250 µM de desoxinucleótidos, 20 pmoles de cada oligonucleótido cebador, 1 U de Taq polimerasa, 70 ng de ADN genómico de amiba y tampón de reacción. Se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización 1 min a 94°, hibridación 1 min a 44° y extensión 2 min a 72°. Se realizaron 35 ciclos en estas condiciones.

2.6-Clonación

Los fragmentos de ADN producto de la reacción de PCR fueron purificados de gel de agarosa, reparados y fosforilados previo a la reacción de ligación con el pBSSK. El pBSSK para ligación fue digerido con la enzima Sma I y defosforilado con fosfatasa alcalina.

2.7-Transformación

Se realizó según el método del choque térmico (Hanahan, 1983). Se incuban 100 µl de células competentes con 10 µl de reacción de ligación (20 ng de ADN) y se incuban en hielo durante 30 min. La mezcla se somete a un choque térmico de 90 seg a 37° y se pasa

a hielo 5 min. Luego se recuperan las células en medio SOC durante una hora y se siembran en LB-agar con el antibiótico adecuado

2.8-Extracción de ADN plasmídico

La extracción de plásmidos de *E. coli* se realizó por el método de la lisis alcalina, usando el Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD), según el protocolo del fabricante.

2.9-Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Fluorescente Automatizada del IBT, por el método de Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing (Fluorescence-Based Sequencing), y el equipo utilizado fue un secuenciador modelo 377-18 marca Perkin Elmer/Applied Biosystems.

2.10-Cuantificación

De ADN: Se midió espectrofotométricamente la DO a 260 nm y se realizaron los cálculos teniendo en cuenta que 1 DO₂₆₀ equivale a 50 µg/ml de ADN. Para aplicaciones menos sensibles se comparó la banda en geles de agarosa con marcadores de peso molecular en cantidades conocidas.

De proteínas: En aplicaciones que exigieran menor exactitud en las medidas se midió espectrofotométricamente la DO₂₈₀ y se calculó la concentración asumiendo que 1 DO₂₈₀ equivale a 1 mg/ml de proteína (en el caso de anticuerpos 1.4 DO₂₈₀ corresponde a 1 mg/ml). Para cuantificación de proteína total en lisados de trofozoítos se utilizó el método del ácido bicinonínico (BCA), por medio del Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). En cada ensayo se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA dentro del rango de trabajo.

2.11-Electroforesis de ADN

El ADN fue separado en geles de agarosa al 1% sumergidos en TAE, 0.5 µg/ml de EtBr, durante tiempos variables de 30 a 90 min a 100V. La visualización y registro se realizaron en un transiluminador UV y fotografía Polaroid.

2.12-Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos se escindieron del gel y se purificaron por adsorción a silica-gel usando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

2.13-Tratamiento enzimático del ADN

Con endonucleasas de restricción: las digestiones se realizaron en volúmenes entre 15 y 50 μ l, con 1 a 5 U de enzima por μ g de ADN. Los tampones, temperatura y tiempos utilizados fueron los recomendados por los proveedores de cada enzima.

Con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*: las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 μ l, con 250 μ M de desoxinucleótidos, el tampón proporcionado por el proveedor, 100 ng de ADN a reparar y 2 U de enzima. Se incubó la mezcla 40 min a TA.

Con fosfatasa alcalina: las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 μ l, con el tampón proporcionado por el proveedor, 500 ng de ADN a defosforilar y 10 U de enzima. Se incubó la mezcla 40 min a 37°C.

Con polinucleótido quinasa: las reacciones se realizaron en volúmenes de 50 μ l, con 100 μ M de ATP, el tampón proporcionado por el proveedor, 100 ng de ADN a fosforilar y 10 U de enzima. Se incubó la mezcla 40 min a 37°C.

Con la ADN ligasa del fago T4: las reacciones se realizaron en volúmenes de 20 μ l, con 100 μ M de ATP, el tampón proporcionado por el proveedor, 1 U de enzima, 50 ng de vector a ligar e inserto en un exceso de 2 con respecto al vector. La mezcla se incubó 12 horas a 15°C.

2.14-Electroforesis de proteínas

Se llevaron a cabo para separar proteínas según tamaño (SDS-PAGE), de acuerdo a técnica descrita previamente (Laemmli, 1970). Los geles variaron en porcentaje de acrilamida de 10% a 15%. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TANK, a 100 V.

2.15-Transferencia de proteínas a membrana

Para westerns cuantitativos: Luego de haber sido separadas en SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo (*Inmobilon P*, Millipore) de la siguiente forma: finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 5 min en el tampón de transferencia (CAPS 10 mM pH 11, 10% metanol). La membrana se sumergió durante 1 min en MeOH y luego se equilibró 10 min en el tampón de transferencia. Luego se montó el sandwich de manera de que el gel y la membrana quedaran entre 2 papeles filtro Whatman #1 y se transfirió en inmersión durante 2 h con agitación a 40 V en una cámara de electrotransferencia de inmersión (Hoeffer Scientific).

Para westerns semicuantitativos la transferencia de proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) de la siguiente forma: luego de la electroforesis, los geles y los papeles de filtro se sumergieron durante 5 min en el tampón de transferencia semi-seca. La membrana se equilibró 5 min en el tampón de transferencia. Luego se montó el sandwich de manera de que el gel y la membrana quedaran entre 6 papeles filtro Whatman #1 y se transfirió durante 1 h a 400 mA en una cámara de electrotransferencia semiseca HEP-1 (OWL).

2.16-Western blots

Las proteínas transferidas a membrana (nylon o nitrocelulosa) fueron inmunodetectadas de la manera siguiente: se bloqueó la membrana de 1 a 12 horas a TA en agitación, con 5% de leche en polvo en TBST. La detección se llevó cabo con 1 µg/ml de anticuerpo específico en TBST con 0.1% de leche en polvo, 1 h en agitación a TA. Se lavó tres veces la membrana durante 10 min en TBST. Se incubó la membrana 1 h a TA en agitación con el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (ZYMED) diluido a 1/2500 en TBST 0.1% de leche en polvo. Se lavó la membrana 3 veces durante 10 min y se reveló la reacción con NBT/BCIP en tampón de reacción (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM y MgCl 10 mM). La reacción se detuvo con 5 mM EDTA.

2.17-Expresión de las proteínas recombinantes en *E coli*

Tanto el vector pQE30 como el pGEX regulan la expresión de las proteínas recombinantes por medio del represor *lac I*. La inducción de la expresión se realizó en ambos casos cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0.6, con 1 mM isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Se mantuvo el cultivo inducido 3 h a 37°C antes de realizar la lisis.

2.18-Purificación de las proteínas recombinantes

Para el caso de las proteínas producidas a partir del vector pQE30 se siguió el procedimiento indicado por el fabricante (The QIAexpressionist, 1997). En el caso de la expresión en pGEX se siguió el método descrito por el autor (Smith y Johnson, 1988).

2.19-Obtención de anticuerpos policlonales

2.19.1-Derivatización de BSA por medio de SPDP

El SPDP posee un grupo de N-hidroxisuccinimida, que reacciona con aminas primarias, y un grupo de piridil disulfuro que reacciona con sulfhidrilos. Se hizo reaccionar el SPDP con las aminas primarias de la BSA, incubando durante 1 h a TA 10 mg de BSA con 25 μ l de una solución de SPDP 20 mM (en DMSO) en 1 ml de tampón fosfato pH 6.6. Se separó el SPDP sin reaccionar de la BSA derivatizada por medio de una filtración en gel usando una columna de Sephadex G-100. Se tomó una alícuota (25 μ l) de la BSA-SPDP y se trató con 1 ml de 300 mM β -ME en tampón fosfato pH 6.6. Se midió la DO_{343} y se calculó la cantidad derivatizada sabiendo que la reacción con el β -ME libera la piridina-2-tiona del SPDP y ésta tiene coeficiente de extinción molar a 343 nm de $8.08 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.19.2-Conjugación de péptidos a BSA

Los péptidos conteniendo sulfhidrilos libres se incubaron toda la noche a TA en tampón fosfato pH 6.6 con la BSA-SPDP, en un exceso molar de 2. Se midió la DO_{343} y se calculó el número de péptidos acoplados por BSA. Se dializó contra PBS para obtener BSA-péptido libre de péptido sin reaccionar.

2.19.3-Conjugación de péptidos a Thiopropyl-Sepharosa para la inmunopurificación

Los péptidos conteniendo sulfhidrilos libres se incubaron toda la noche a TA en tampón fosfato pH 6.6 con la Thiopropyl-Sepharosa, en un exceso molar de 2. Se midió la DO_{343} y se calculó el número de péptidos acoplados a la matriz sabiendo que cada péptido al acoplarse libera una piridina-2-tiona

2.19.4-Procesamiento de sueros y purificación de anticuerpos específicos.

Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados fueron sometidos a una precipitación en sulfato de amonio 50% durante 4 h a 4°C. Se centrifugó el precipitado 10 min a 8000 RPM, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 volumen de 100 mM Tris pH 8. Para eliminar el exceso de sulfato de amonio se dializó contra el mismo tampón toda la noche. Se recirculó tres veces el producto de la precipitación en la columna de inmunopurificación con el péptido acoplado. Se lavó la columna con 100 mM Tris pH 8 y se monitoreó cada fracción obtenida en el espectrofotómetro. Cuando la DO_{280} se redujo a 0.02 se procedió a lavar la columna con 100 mM Tris pH 8 0.5 M NaCl y cuando las fracciones no presentaron una DO_{280} apreciable se procedió a la elución de los anticuerpos. Ésta se realizó con ácido acético 0.1 M y colectando fracciones de 1 ml en tubos que contenían 0.5 ml de Tris 1 M pH 8

2.19.5-Determinación de título de anticuerpos.

El título de anticuerpos se determinó por medio de ELISA. Una placa de 96 pozos se sensibilizó durante toda la noche a 4°C con 200 ng de antígeno por pozo, en 150 µl de tampón de carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5. Se lavó 3 veces con 200 µl de solución de lavado (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, $MgSO_4$ 40 mM, Tween20 0.05%). Luego se bloquearon los pozos durante 1 h a TA con 150 µl de solución de bloqueo (Tris HCl 50 mM pH 8, gelatina 0.5%, Tween 20 0.2%). Se hicieron diluciones seriadas 1:3 de los sueros partiendo de una inicial 1:30, en 100 µl de tampón de reacción (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, gelatina 1mg/ml, Tween 20 0.05%). Se incubó 1 h a TA y se lavó 3 veces. Se reveló agregando 100 µl de anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado a

peroxidasa, diluido 1:2500 en tampón de reacción e incubando 1 h a TA. La reacción cromogénica se realizó con 50 µl del sustrato ABTS, a 500 µg/ml, en la solución de reacción de ABTS proporcionada por el fabricante. Se detuvo la reacción con 25 µl de ácido fluorhídrico 50% y se leyó en un lector de placas a 405 nm.

2.20-Preparación de los lisados de *E. histolytica*

Se centrifugaron los cultivos de amibas a 500 g durante 5 min. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió la masa celular en 500 µl de PBS frío. Se contaron las células en el hemocitómetro, se centrifugaron 5 min a 500 g y se resuspendieron en PBS frío de manera de tener una densidad celular de 2×10^6 cél /ml. Se agregó un volumen igual de tampón de lisis 2x (Glicerol 10%, SDS 2.5%, Tris HCl 50 mM pH 6.8, E64 0.5 mM, PMSF 5 mM) y se lisaron por agitación en vórtex durante 30 s. Para western semicuantitativos se cargó en gel un volumen determinado según el número de células necesarias. En el caso de western cuantitativo se midió la cantidad de proteína total de cada muestra (triplicados de trofozoítos controles y tratados con PNA scrambled y PNA antisentido) y se normalizó con tampón de lisis 1x.

2.21-Medición de la proliferación de trofozoítos

Los ensayos de proliferación de trofozoítos se realizaron en medio BI-S-33 a 37°C a los tiempos y con las concentraciones de PNA indicados. Las incubaciones se realizaron en tubos de 5 ml con un inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos tomados en fase logarítmica. Para cada ensayo se incubaron por triplicado: un control sin PNA, trofozoítos tratados con PNA antisentido y trofozoítos tratados con PNA scrambled a la misma concentración del antisentido. Los trofozoítos se cosecharon enfriando 5 min el tubo a contar y centrifugando a 500 g. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 500 µl de PBS, se tomaron 20 µl y se mezclaron con 20 µl de Trypan Blue. Se contaron en un hemocitómetro aquellas células que fueran impermeables al colorante.

2.22-Inmunocitoquímicas

Trofozoítos tratados con PNA y controles fueron cultivados de 24 a 96 h. Posteriormente se tomó 1 ml de cada cultivo y se colocó sobre un cubreobjeto en cada pozo de una placa de cultivo celular de seis pozos. Con la finalidad de que los trofozoítos se adhirieran al cubreobjeto se incubó la placa durante 2 h a 37°C en una cámara anaeróbica. Una vez que los trofozoítos estuvieron adheridos se procedió a la fijación de la siguiente manera: se aspiró suavemente el medio de cultivo y se agregó 1 ml de solución de fijación (4% paraformaldehído en PBS), incubándose durante 30 min a 37°C. Se aspiró la solución de fijación y se lavó 3 veces con PBS. Las muestras se bloquearon 15 min con 50 mM NH₄Cl en PBS. Se aspiró la solución de bloqueo y se lavó 3 veces con PBS. Luego se incubó 1 h con el primer anticuerpo en PBS a concentraciones entre 1 y 6 µg/ml. Se aspiró la solución y se lavó 3 veces con PBS. Posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-conejo acoplado al fluoróforo Alexa 488, diluido 1/1000 en PBS. Se aspiró la solución y se lavó 3 veces con PBS. En los casos en que se tiñeron núcleos, la muestra se incubó 5 min con 2 µg/ml de Ioduro de Propidio en PBS. Como último paso las muestras se montaron sobre un portaobjeto en el medio de montaje *antifade* Vecta Shield.

2.23-Ensayos de citotoxicidad

Trofozoítos tratados con PNA y controles fueron cultivados 48 y 72 h. Se cosecharon, lavaron con PBS y resuspendieron en 1 ml de medio DMEM sin suero, previo a contarlos en un hemocitómetro. Las células HeLa fueron cultivadas 24 h en medio DMEM con 5% de SBF en una placa de 96 pozos, partiendo de un inóculo de 3×10^4 células por pozo. Se lavaron las células con medio DMEM sin suero y luego se incubaron en presencia de trofozoítos en una relación de 1 HeLa:2 trofozoítos durante una hora a 37°C y 5% CO₂ en 200 µl de medio DMEM sin suero. Luego se enfrió la placa 10 min en hielo y se aspiró el medio con trofozoítos con un capilar. Se lavó con PBS frío 3 veces y se agregaron 200 µl de tampón de lisis (Tris HCl 100mM pH 7.4, NaCl 154 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NP40 0.1%) suplementado con 1.5 µM del colorante Sytox Green, que se intercala en el ADN. Se midió la fluorescencia en Cytofluor a $\lambda_{EX}=485$ nm y una $\lambda_{EM}=523$ nm.

Resultados

-Reacción de PCR para CP5 y amibaporo

Con el objetivo de clonar los genes de amibaporo y CP5 en vectores de expresión, obtener las proteínas recombinantes y producir anticuerpos policlonales contra éstas en conejo, se procedió a la obtención de los genes. A partir de las secuencias publicadas de la cisteín proteasa 5 (número de acceso del GenBank X91644; Jacobs *et al.*, 1998) y del amibaporo A (número de acceso del GenBank M83945; Leippe *et al.*, 1992) se diseñaron los oligonucleótidos 5'-poro, 3'-poro, 5'-CP5 y 3'-CP5 (ver Materiales y Métodos), de manera de obtener los genes completos como resultado de las reacciones de PCR. Se realizaron las mismas y se analizó el producto por electroforesis en gel de agarosa. Se observaron fragmentos del tamaño esperado, se escindieron las bandas del gel y se procedió a la clonación

-Clonado de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR en pBSSK.

Los fragmentos obtenidos de amibaporo y CP5 fueron reparados con la enzima Klenow de manera de obtener extremos romos, y fosforilados. El plásmido pBSSK fue digerido con la enzima Sma I y defosforilado para reducir el fondo de autoligación. Se procedió a realizar ambas reacciones de ligación y transformación. Se extrajeron los plásmidos de las colonias obtenidas y se digirieron con las enzimas Bam HI y Hind III, que poseen sitios de corte en los oligonucleótidos utilizados. De los plásmidos que liberaron un inserto del peso esperado, se tomó uno correspondiente a amibaporo y otro correspondiente a CP5 y se secuenciaron. La secuenciación confirmó que las clonaciones habían sido exitosas

-Clonado en el vector de expresión pQE30 de los genes codificantes para CP5 y amibaporo y ensayos de expresión

Los fragmentos que contienen los genes CP5 y amibaporo se escindieron del pBSSK utilizando las enzimas de restricción Bam HI y Hind III, presentes en el sitio de multiclonación del vector pQE30. Se preparó el vector para la ligación digiriendo con las

enzimas de restricción mencionadas y defosforilando. Se ligó el vector digerido con el fragmento a clonar y se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa XL1 Blue. Las clonaciones se confirmaron por digestión. Se indujo la expresión en cultivos de 100 ml y las células se lisaron en condiciones desnaturalizantes. Se circularon los lisados por una columna de sepharosa Ni-NTA y se hicieron lavados en diferentes condiciones de selectividad. Se eluyó con 200 mM imidazol y se analizaron las fracciones obtenidas en electroforesis en gel de poliacrilamida. No se observó diferencia entre los controles de *E. coli* sin transformar y sin inducir y las colonias con la construcción inducidas con 1mM IPTG. Los niveles de inducción fueron muy bajos, y luego de analizar 6 colonias transformadas con amibaporo y 6 con CP5 con los mismos resultados, se optó por realizar las clonaciones en el vector pGEX.

-Clonado en el vector de expresión pGEX (Smith y Johnson, 1988) de los genes amibaporo y CP5 y ensayos de expresión

El fragmento que contiene el gen amibaporo y el que contiene a CP5 se escindieron de pBSSK utilizando las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se escindió primero con HindIII y se reparó el fragmento antes de digerir con BamHI, ya que el clonado se realizó con un extremo romo. Se preparó el vector para la ligación digiriendo con las enzimas de restricción BamHI y SmaI. Se ligó el vector digerido con el fragmento a clonar y se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa XL1Blue. Las clonaciones se confirmaron por digestión. Se indujo la expresión en cultivos de 10 ml y las células se lisaron por sonicación. Se circularon los lisados por una columna de sepharosa-glutación, capaz de unir la proteína glutación-S-transferasa (GST) que queda fusionada a la proteína clonada en el vector, y se hicieron lavados en diferentes condiciones de selectividad. Se eluyó con 5 mM de glutación reducido y se analizaron las fracciones obtenidas en electroforesis en gel de poliacrilamida. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos en el caso de pQE30, con niveles de expresión indetectables en SDS-PAGE.

Debido a la ausencia en la bibliografía consultada de referencias a la expresión de estas dos proteínas, y a la dificultad que ésta presentaba, se decidió intentar otra aproximación

Con el objetivo de conjugarlos a un "carrier" e inmunizar conejos se sintetizaron péptidos a partir de las secuencias de amibaporo y CP5. La secuencia del péptido correspondiente a amibaporo (pAp) fue diseñada teniendo en cuenta que existen otros dos amibaporos menos abundantes, el B y el C (Leippe *et al.*, 1994). El fragmento elegido abarca de los aminoácidos 14 al 33 y presenta la divergencia más alta entre las diferentes formas, con el objetivo de aumentar la especificidad de los anticuerpos. En el extremo amino terminal se añadió una cisteína para facilitar el acoplado al acarreador. Para CP5 se optó por sintetizar un péptido ya utilizado por otros grupos para obtener anticuerpos contra esta proteína (Jacobs *et al.*, 1998). El péptido (pCP5), que abarca de los aminoácidos 100 al 111, es un inmunógeno altamente específico para CP5. En su extremo amino terminal fue agregada una cisteína (ver Materiales y Métodos)

-Conjugación a BSA de los péptidos sintetizados.

Se derivatizó seroalbúmina bovina con SPDP, un entrecruzante bifuncional que permite formar enlaces con sulfhidrilos, para acoplar los péptidos sintetizados por su cisteína. El rendimiento obtenido fue de 6 SPDP por molécula de BSA. Se hizo reaccionar los péptidos sintetizados con la BSA derivatizada y se calculó la cantidad reaccionada para cada uno, siendo en el caso de pCP5 de 4 a 5 péptidos por molécula de BSA y para pAp 1 por BSA. La reacción se verificó por retardo en la migración de BSA con los péptidos acoplados en electroforesis en gel de poliacrilamida (Fig. 6).

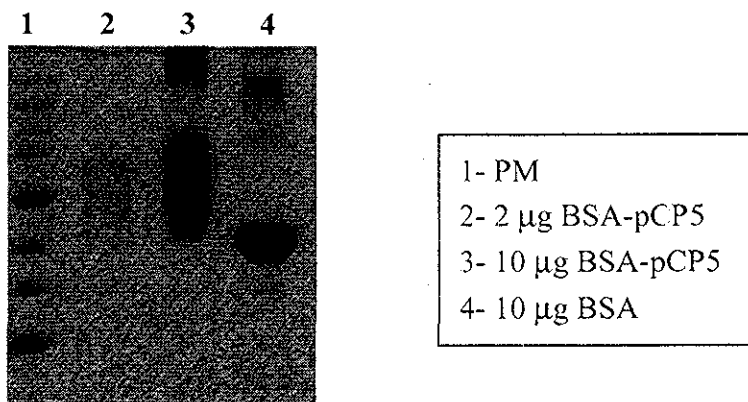


Fig. 6: SDS-PAGE en condiciones no reductoras de BSA y BSA acoplada a péptido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Inoculación de conejos y obtención y purificación de anticuerpos contra los péptidos pCP5 y pAp

Se inocularon dos conejos para cada antígeno con 200 µg del péptido-BSA, manteniendo un esquema de inmunización semanal. Se monitoreó la respuesta inmune por ELISA y cuando los títulos alcanzaron el valor de 50000 para el caso de CP5 se sangraron a blanco los conejos. Para la purificación por cromatografía de afinidad se conjugó el péptido a una columna de tiopropil-sepharosa. Se hizo circular el suero por la columna y se eluyó con ácido acético 0.1M. La especificidad de los anticuerpos se verificó por western contra lisados amibianos sin que se apreciara señal (Fig. 7), y dot blot, donde sí se detectó reconocimiento (Fig. 8). Para el caso del amibaporo, el trabajo se encuentra actualmente en la etapa de inmunopurificación, por lo que no se incluyen en esta tesis resultados vinculados a estos anticuerpos.

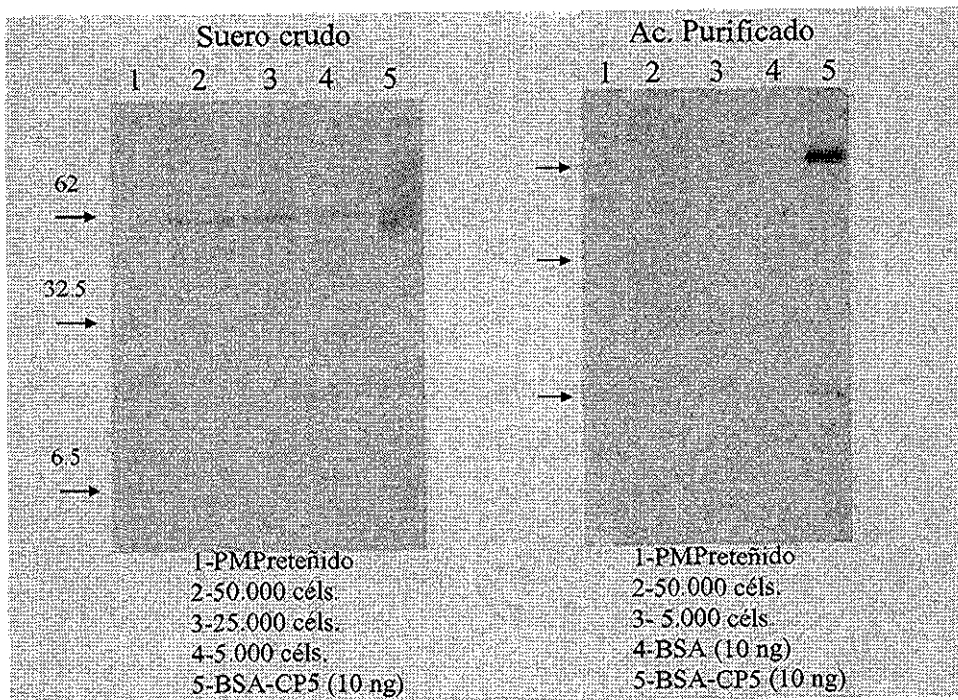


Fig 7: Westerns blots de lisados de diferentes cantidades de amibas revelados con anticuerpos anti-CP5 Izquierda: Western revelado con el suero sin purificar. Derecha: Western revelado con anticuerpos anti-CP5 inmunopurificados. Como controles se incluyeron BSA y BSA acoplada al péptido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

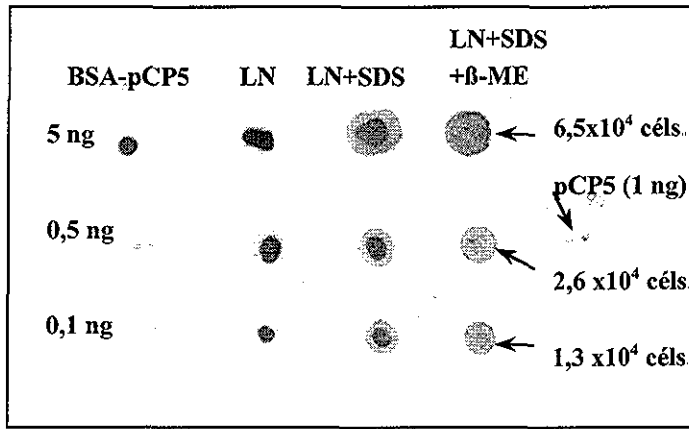


Fig. 8: Dot-blot de lisados con diferentes cantidades de amibas revelados con anticuerpos anti-CP5 inmunopurificados. LN: lisados por sonicación. Se indican las cantidades de proteína y de amibas. Como controles se incluyeron pCP5 y BSA acoplada al péptido.

-Efecto de los PNAs sobre la proliferación de trofozoítos

ERD2

Se incubaron trofozoítos de la cepa HK9 con diferentes concentraciones del PNA contra ERD2 y sus correspondientes controles durante 96 y 120 horas. Se detectó que a concentraciones mayores que 10 μM el PNA contra ERD2 precipitaba en el medio de cultivo, por lo que ésta fue la máxima concentración utilizable. A las 96 y 120 horas se logró una inhibición del 60% en la proliferación a una concentración de PNA de 10 μM (Fig. 9).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

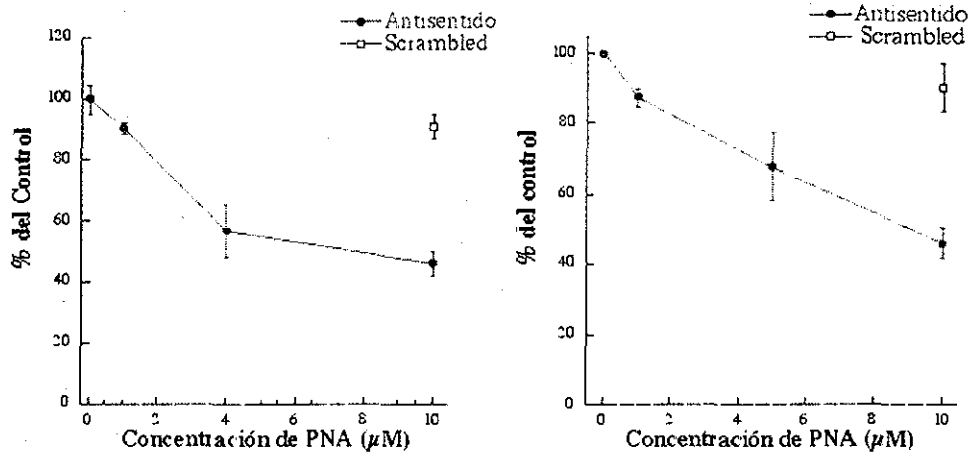


Fig. 9. Curva dosis-respuesta del tratamiento de amibas con el PNA contra ERD2. A la izquierda se muestra los resultados obtenidos tras incubar los trofozoítos 96 h con el PNA, a la derecha luego de una incubación de 120 h.

Rab8

Se incubaron trofozoítos de la cepa HK9 con diferentes concentraciones del PNA contra Rab8 y su correspondientes controles durante 96 horas, sin que la proliferación se viera afectada (Fig. 10).

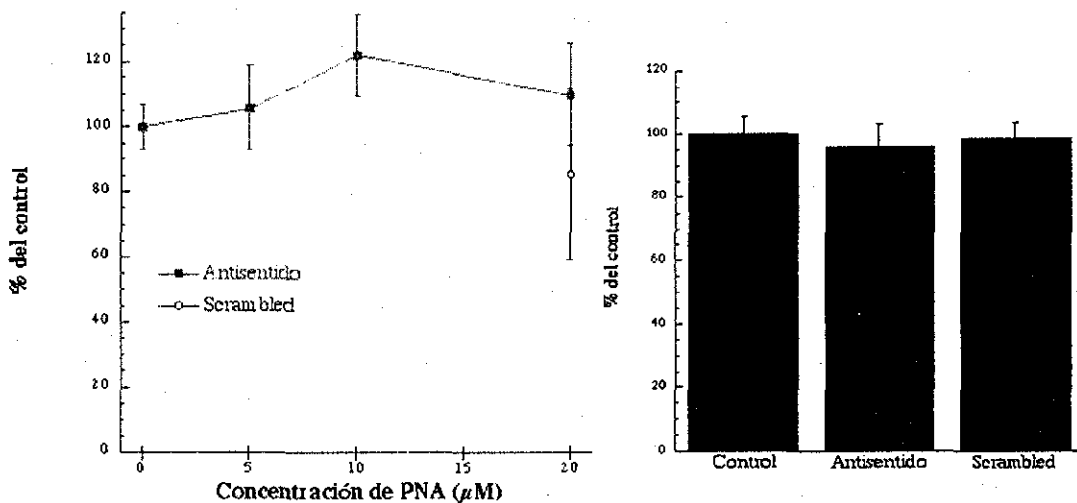


Fig. 10: Izquierda: Curva dosis respuesta de la incubación durante 96 h de trofozoítos con el PNA contra Rab8. Derecha: Proliferación de trofozoítos luego del tratamiento durante 96 h con el PNA contra Rab8 20 µM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sec61

Se incubaron trofozoítos de la cepa HK9 con una concentración de 20 μM del PNA contra Sec61 y sus correspondientes controles durante 96 horas. Se logró una inhibición del 60% en la proliferación (Fig 11).

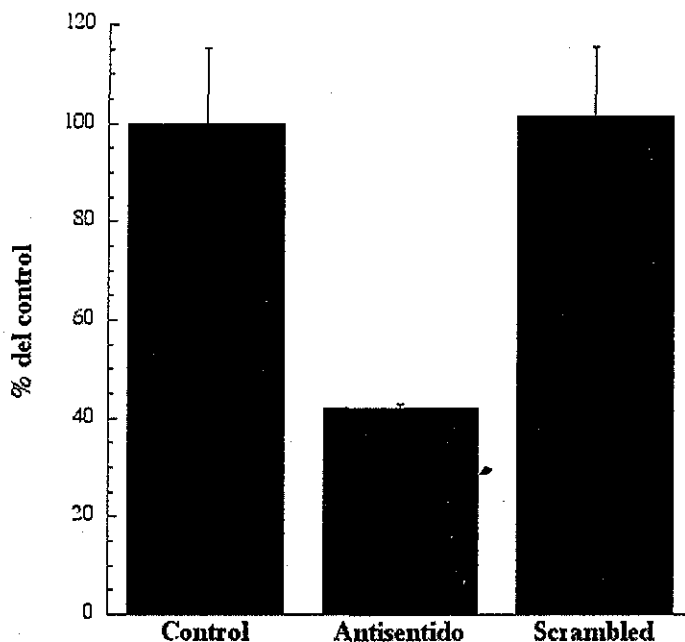


Fig 11: Proliferación de trofozoítos tratados 96 h con el PNA contra Sec61 20 μM

Síntesis de un PNA contra el 5' UTR del ARNm de la proteína Rab8

Se sintetizó por química tBoc el PNA Rab8-UTR, de 17 residuos, como alternativa para potenciar el efecto antisense sobre esta proteína. Se ha descrito que PNAs antisense contra regiones "río arriba" de la región codificante de mRNAs producen una inhibición más efectiva de la expresión de proteína, presumiblemente por una interferencia estérica con el ensamblado del ribosoma (Doyle, 2001). Dado que el PNA dirigido contra el codón de inicio de la traducción de Rab8 no tuvo efecto en la proliferación, se buscó probar la posibilidad de desplazar el sitio blanco del PNA.

Rab8-UTR

Se incubaron trofozoítos de la cepa HK9 con diferentes concentraciones del PNA contra Rab8-UTR y sus correspondientes controles durante 96 horas, sin que la proliferación presentara diferencias significativas entre los controles y los trofozoítos tratados con los PNA antisentido y scrambled (Fig. 12).

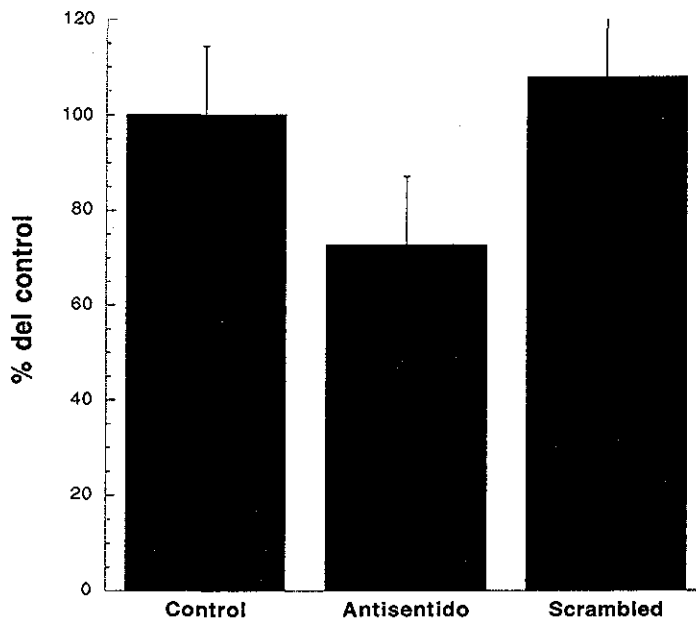


Fig 12: Proliferación de trofozoítos tratados 96 h con el PNA contra Rab8-UTR 20 μ M

-Efecto de los PNAs sobre la expresión de proteínas

Rab8

Se procesaron los trofozoítos luego de 96 h de incubación con 20 μ M del PNA contra Rab8 y sus correspondientes controles, y se realizó un western cuantitativo, normalizado por cantidad de proteína total, donde se detectó por densitometría una caída de la expresión de Rab8 de alrededor de 60% (Fig 13).

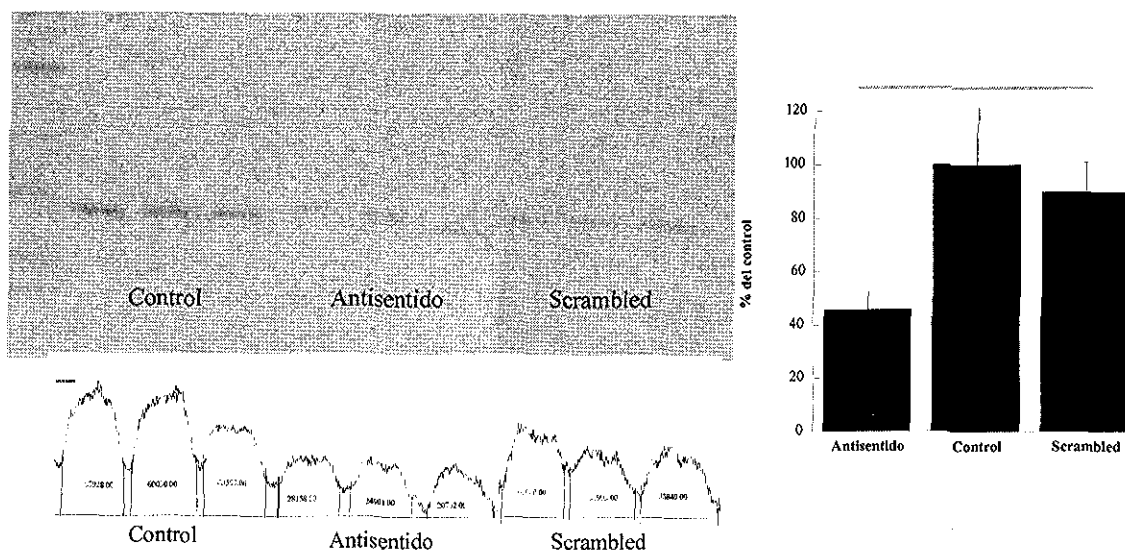
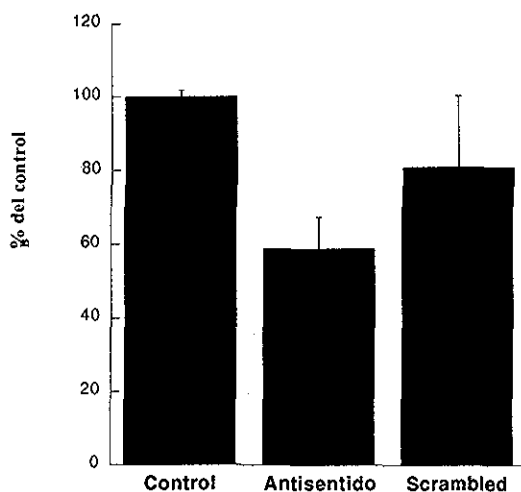


Fig 13: Densitometría del western cuantitativo de amibas tratadas con PNA contra Rab8, revelado con anticuerpos anti-Rab8, y representación gráfica de la expresión relativa obtenida

ERD2

Se procesaron los trofozoítos luego de 96 h de incubación con 10 μ M del PNA contra ERD2 y sus correspondientes controles, y se realizó un western cuantitativo, normalizado por cantidad de proteína, donde se detectó por densitometría una caída de la expresión de ERD2 de alrededor de 40%. Este resultado se publicó como parte de el artículo incluido en el Anexo (Fig. 14).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 14: Representación gráfica de la expresión relativa obtenida en el western cuantitativo de amibas tratadas 96 h con PNA contra ERD2, revelado con anticuerpos anti-ERD2

Sec61

Se procesaron los trofozoítos luego de 96 h de incubación con 20 μ M del PNA contra Sec61 y sus correspondientes controles, y se realizó un western cuantitativo, normalizado por cantidad de proteína total, donde se detectó por densitometría una caída de la expresión de Sec61 de alrededor de 80% (Fig. 15).

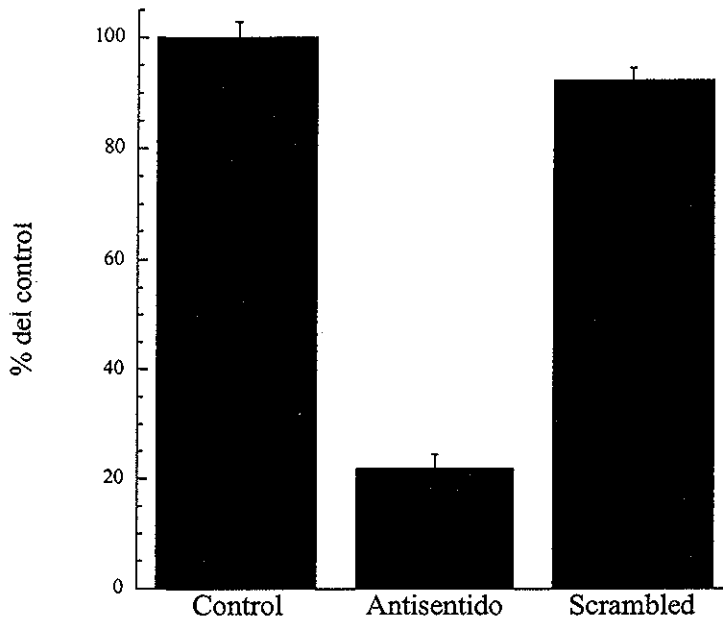


Fig. 15: Representación gráfica de la expresión relativa de Sec61 obtenida en amibas tratadas con PNA contra Sec61

Rab8-UTR

Se procesaron los trofozoítos luego de 96 h de incubación con 20 μ M del PNA contra Rab8-UTR y sus correspondientes controles, y se realizó un western cuantitativo, normalizado por cantidad de proteína total. Se detectó por densitometría que la expresión de Rab8 no mostró diferencias significativas entre los controles y los trofozoítos tratados con los PNA antisentido y scrambled (Fig. 16).

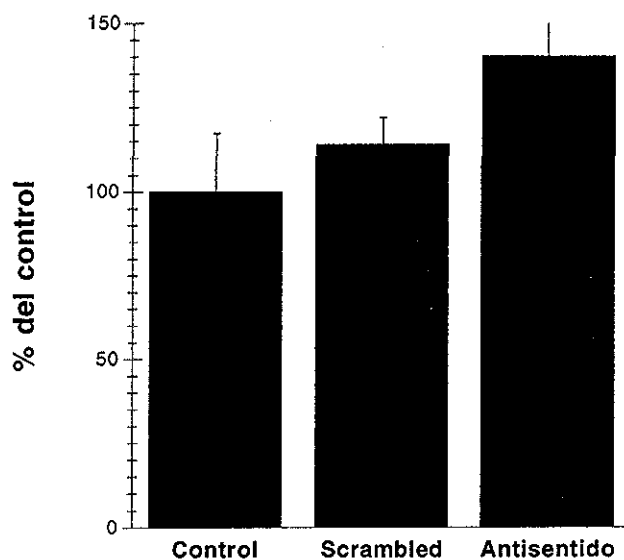


Fig 16: Representación gráfica de la densitometría y expresión relativa obtenida del western cuantitativo de amebas tratadas con PNA contra Rab8-UTR, revelado con anticuerpos anti-Rab8

-Evaluación morfológica del efecto de los diferentes PNAs sobre la distribución subcelular de CP5 mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal.

Se puso a punto la detección mediante inmunocitoquímica de la proteína CP5 en trofozoítos permeabilizados y sin permeabilizar. Los trofozoítos fueron fijados en 4% de paraformaldehído, permeabilizados (si era el caso) con Tritón al 0.2%, bloqueados e incubados con el anticuerpo anti-CP5 a una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$. También se realizó un experimento similar utilizando el anticuerpo monoclonal CD6 que reconoce específicamente la lectina Gal/NAc. Se incubó con el segundo anticuerpo conjugado al fluoróforo Alexa 488 y se observaron las muestras al microscopio confocal a diferentes potencias de láser. Se realizó el mismo experimento luego de incubar los trofozoítos 96 horas con los PNAs dirigidos contra el inicio de la traducción de ERD2, Sec61 y Rab8, no observándose diferencias de distribución ni intensidad de la señal con respecto a los trofozoítos sin tratar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ERD2

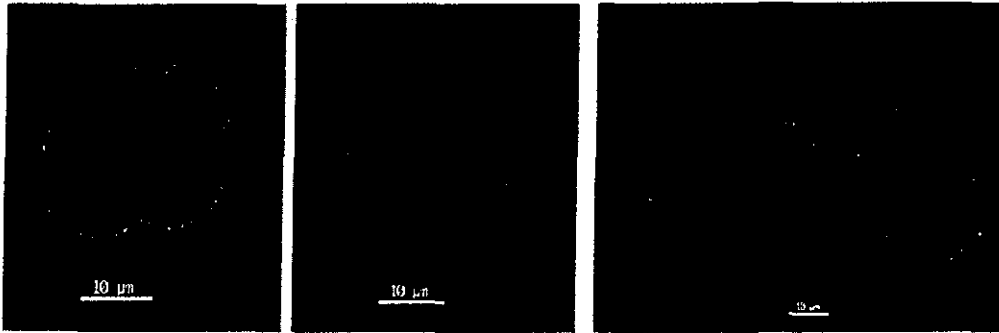


Fig 17: Cortes ópicos de trofozoítos incubados durante 96 h con PNA contra ERD2, revelados con anticuerpo anti-CP5 Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled

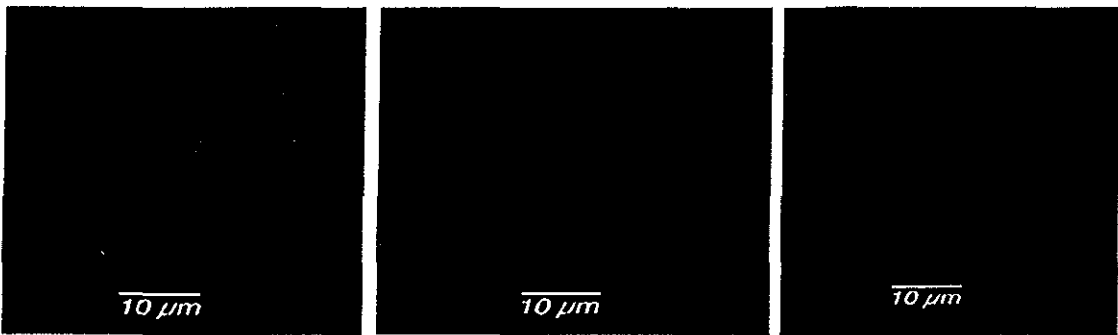


Fig 18: Proyecciones ecuatoriales de máxima intensidad de trofozoítos incubados durante 96 h con PNA contra ERD2, permeabilizados y revelados con anticuerpo anti-CP5 El núcleo se observa en rojo, la señal de CP5 en verde Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled

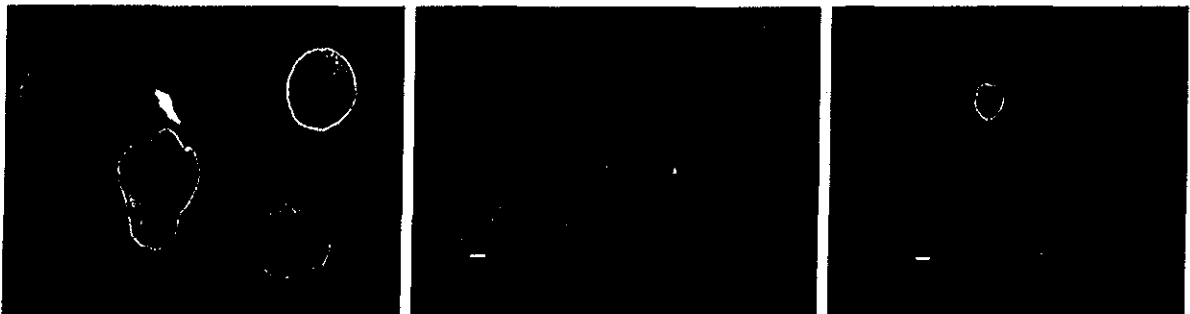


Fig 19: Cortes ópicos de trofozoítos incubados durante 96 h con PNA contra ERD2, revelados con el anticuerpo monoclonal CD6 Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Rab8

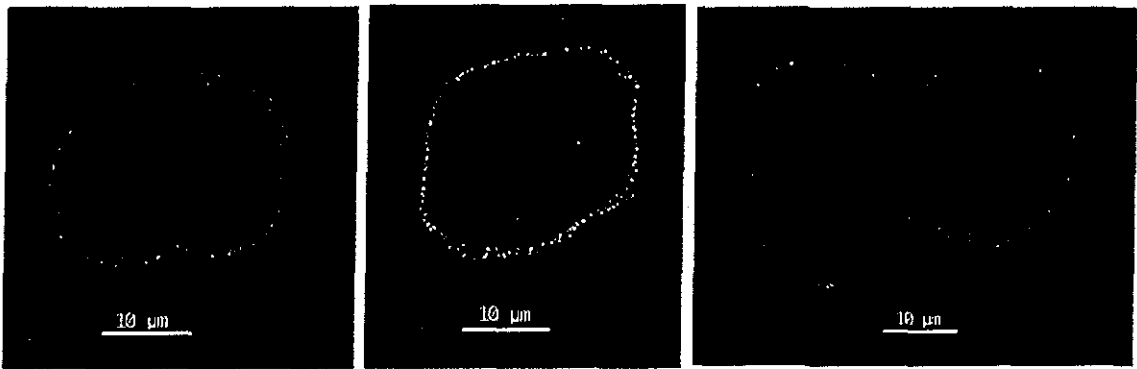


Fig 20: Cortes picos de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Rab8, revelados con anticuerpo anti-CP5. Izquierda: control sin PNA. Centro: incubado con PNA antisentido. Derecha: incubado con PNA scrambled.

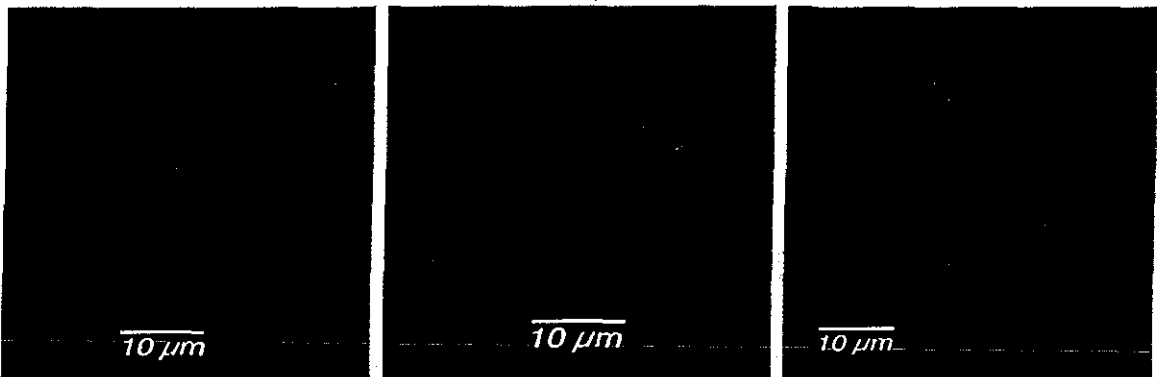


Fig 21: Proyecciones ecuatoriales de máxima intensidad de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Rab8, permeabilizados y revelados con anticuerpo anti-CP5. El núcleo se observa en rojo, la señal de CP5 en verde. Izquierda: control sin PNA. Centro: incubado con PNA antisentido. Derecha: incubado con PNA scrambled.

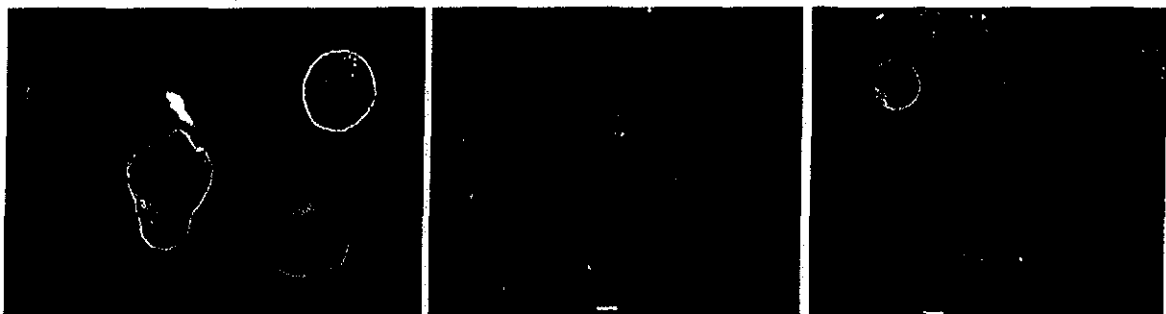


Fig 22: Cortes picos de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Rab8, revelados con el anticuerpo CD6. Izquierda: control sin PNA. Centro: incubado con PNA antisentido. Derecha: incubado con PNA scrambled.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sec61

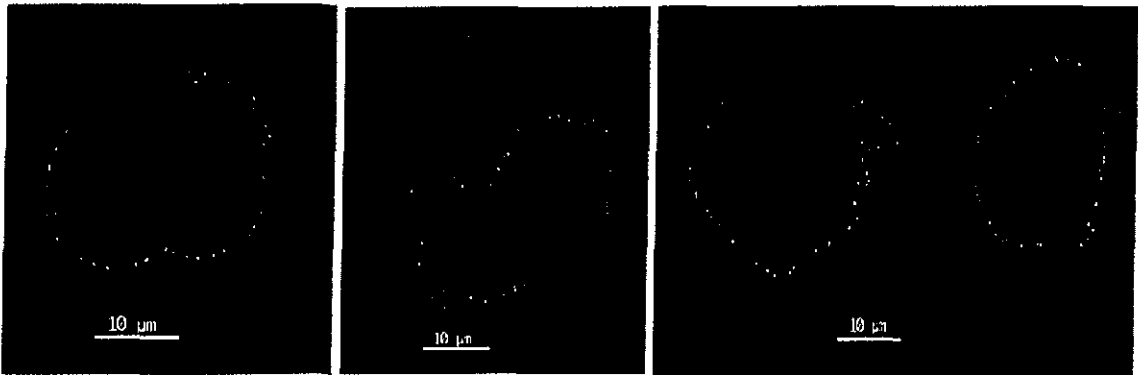


Fig 23: Cortes ópticos de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Sec61, revelados con anticuerpo anti-CP5 Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled

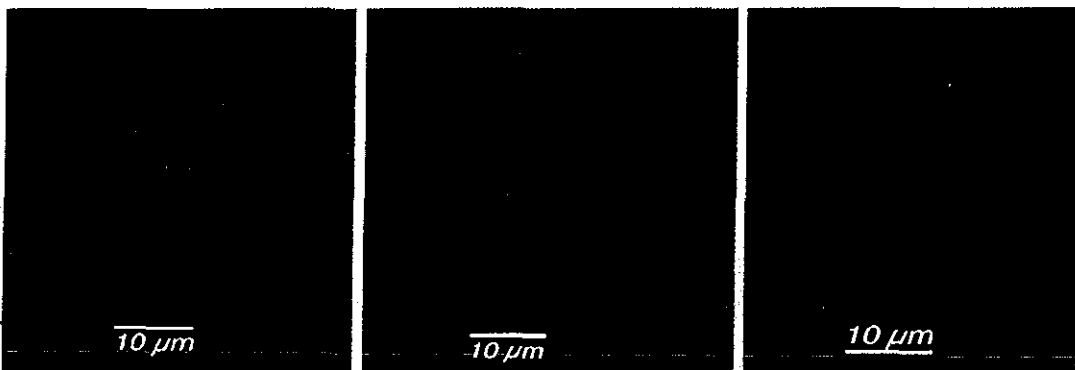


Fig 24: Proyecciones ecuatoriales de máxima intensidad de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Sec61, permeabilizados y revelados con anticuerpo anti-CP5 El núcleo se observa en rojo, la señal de CP5 en verde Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled



Fig 25: Cortes picos de trofozoitos incubados durante 96 h con PNA contra Sec61, revelados con el anticuerpo CD6 Izquierda: control sin PNA Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Rab8-UTR

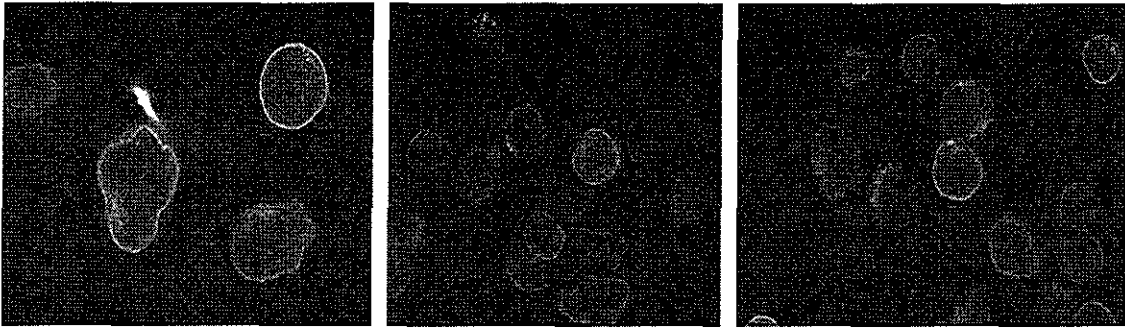


Fig. 26: Cortes ópticos de trofozoítos incubados durante 96 h con PNA contra Rab8-UTR, revelados con el anticuerpo CD6 Izquierda: control sin PNA. Centro: incubado con PNA antisentido Derecha: incubado con PNA scrambled.

-Efecto de los PNAs sobre la citotoxicidad

Se evaluó la capacidad de destrucción de una monocapa de HeLa por parte de trofozoítos de la cepa HM1-IMSS tratados con PNA durante 72 h, y trofozoítos no tratados. Los resultados se muestran en la Fig. 27.

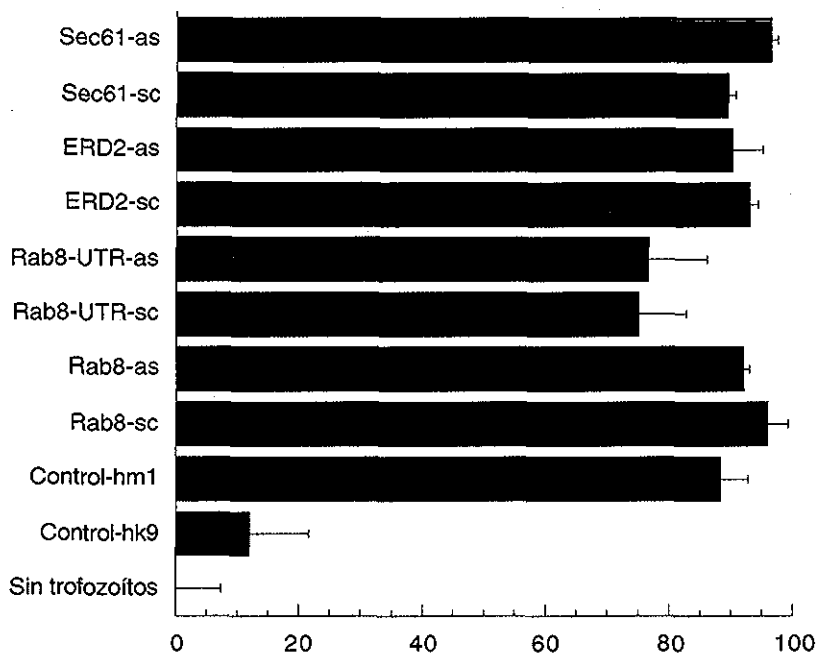


Fig 27: Representación gráfica de el porcentaje de lisis alcanzado por los trofozoítos. as: antisentido,

sc:scrambled

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión y conclusiones

La imposibilidad de producir mutantes nulas en *E. histolytica* ha signado el curso de la investigación de su biología celular. Sólo recientemente se ha logrado la inhibición específica de genes amibianos mediante la transcripción de ARN antisentido. No obstante este avance, la inhibición de la expresión es parcial, y no es posible regular la intensidad del efecto mediante el control de la dosis suministrada de ARN antisentido. Como alternativa para la supresión específica de genes aparecen los PNA, que además de permitir regular dosis, presentan una alta estabilidad *in vivo*, siendo resistentes a la degradación tanto por nucleasas como por proteasas. Se ha demostrado que *E. histolytica* es permeable a los PNA de entre 13 y 20 residuos, y que éstos pueden ejercer efecto sobre genes episomales y cromosómicos.

Uno de los aspectos menos comprendidos de la biología celular de *E. histolytica* es la estructuración y funcionalidad de su vía secretoria. Los estudios realizados con marcadores de esta vía de *E. histolytica* en nuestro laboratorio, han demostrado que ésta no se halla estructurada en organelos, sino dispersa en forma de pequeñas vesículas en el citoplasma. Para explicar esta aparente desestructuración, la supresión específica de genes de la vía secretoria puede ser de gran utilidad para la visualización de fenotipos esclarecedores. La obtención de mutantes y la observación de fenotipos ha sido la estrategia para caracterizar la vía secretoria de otras células eucariotas, por lo que el uso de los PNA para producir defectos de función específicos en *E. histolytica* es una alternativa a explorar.

Elección de los blancos

Si se toma en cuenta la vía secretoria eucariota típica, una proteína pasa por el RE, luego por el aparato de Golgi y finalmente pasa de éste a su destino final. En el presente trabajo se plantea el bloqueo de la vía secretoria de *E. histolytica* en estas tres etapas, mediante la supresión de la expresión de genes asociados a cada una de ellas. En nuestro laboratorio se ha clonado una batería de genes de vía secretoria, de los cuales se escogieron tres como blanco: como marcador de RE se tomó a Sec 61, como marcador de cis-Golgi se eligió a ERD2 y como marcador de post-Golgi a Rab8. Los PNA fueron diseñados para hibridar sobre el codón de iniciación de la traducción y cubrir los primeros 5 codones. Se diseñaron para ser diecisieteámeros teniendo en cuenta la permeabilidad en amiba y la especificidad necesaria. El control utilizado para asegurar que el efecto sea específico fue un PNA con la misma composición de bases que el antisentido, pero con la secuencia alterada. Cada uno de los PNA diseñados fue analizado mediante programas de computadora para asegurar que no formaran estructuras secundarias que pudieran interferir con su acción; así como también fueron contrastados con las bases de datos disponibles para asegurar que la secuencia propuesta pudiera afectar genes no deseados.

Efecto del PNA sobre la proliferación de trofozoítos

A pesar de que en *S. cerevisiae* los efectos de mutaciones en los genes homólogos a los utilizados en el presente trabajo tienen efectos deletéreos, no estaba claro qué efecto podía producir el bloqueo de estos genes en trofozoítos en cultivo. En base a los resultados obtenidos a partir de la curva dosis respuesta con el PNA contra ERD2 y trabajos previos realizados en el laboratorio (Olvera, 1999), se determinó que el tiempo de incubación óptimo es de 96 h, ya que a ese tiempo el efecto del PNA es máximo y los nutrientes del medio de cultivo y la densidad de células son los adecuados. Teniendo en

cuenta la disponibilidad de PNA y trabajos previos, se determinó que la dosis óptima es de 20 μM . En el caso del PNA contra ERD2 no fue posible utilizar esta dosis, ya que éste agrega en el medio de cultivo, así que la concentración máxima utilizada en este caso fue de 10 μM . El efecto sobre la proliferación provocado por el PNA contra ERD2, al igual que el del PNA contra Sec61, fue una caída del 60% con respecto al control, mientras que el PNA contra Rab8 no tuvo efectos sobre la proliferación. El orden de la caída de la proliferación es similar al obtenido con el PNA contra SRP54 (Olvera, 1999). Estos resultados comprobaron que por lo menos dos de los PNAs afectaban específicamente la proliferación. Los efectos no fueron absolutos, lo que abre dos posibilidades. La primera, que efectivamente se estuviera bloqueando la expresión de estos genes amibianos, pero que su función no fuera tan esencial como la de sus homólogos en levadura. La segunda, que los genes escogidos sólo hubieran sido afectados parcialmente por el tratamiento con PNA. Una forma de responder esa pregunta era evaluar la cantidad de cada una de las proteínas presentes en los trofozoítos tratados comparadas con el control.

Efecto de los PNA en la expresión de proteína.

El efecto específico sobre el nivel de expresión las proteínas blanco producido por cada PNA se evaluó por western blots cuantitativos. Cada ensayo se realizó con tres cultivos independientes para cada PNA, su scrambled y los controles, para obtener desviaciones standard que dieran validez estadística al experimento. En los ensayos en que el número de células de un cultivo hizo imposible realizar triplicados se utilizaron duplicados. La normalización se realizó tomando en cuenta la cantidad de proteína total presente en cada lisado. Tomando el lisado con menor cantidad de proteína total como referencia, se diluyeron los demás con el tampón adecuado para la electroforesis. Los efectos específicos fueron diferentes para cada PNA. La menor inhibición de la expresión fue la

de ERD2, de alrededor del 60%, seguida por Rab 8, de alrededor del 70%, y por Sec61, de aproximadamente 80%. Con el gen SRP54 la inhibición máxima fue del 50% (Olvera, 1999). La diferencia en la potencia inhibitoria puede deberse a diferentes causas. Si bien se ha probado la permeabilidad del PNA en amibas con oligómeros de varias longitudes y secuencias, no es posible descartar que la composición de bases pudiera tener algún efecto sobre la entrada a la célula, o sobre su distribución subcelular, que evitaría la acción directa sobre el ARNm. Tampoco se puede descartar que estos factores varíen de célula a célula dentro de la población amibiana, lo que podría llevar a que luego de 96 h de incubación las células que evaluamos sean las más resistentes a la acción del PNA. La inhibición de la expresión obtenidas mediante PNA son del mismo orden que las conseguidas mediante transcripción de ARN antisentido por otros grupos que trabajan en *E. histolytica* (Petri *et al* , 1999)

Relación entre proliferación-nivel de proteína

La relación entre el decremento en la proliferación y en la expresión de proteínas no fue lineal. Las mutantes en levadura hacían presumir que la inhibición de Sec61 iba a tener un grave efecto sobre la proliferación de trofozoítos. Sin embargo, con una caída del nivel de proteína del 80%, el 40% de los trofozoítos sobrevivieron y se dividieron. Con ERD2 la caída de la expresión fue equiparable a la de la proliferación, mientras que sólo con el 30% de la proteína Rab8 presente, los trofozoítos proliferaron normalmente.

Si bien podría tomarse la relación entre caída de la expresión y caída de la proliferación como un indicio de la “esencialidad” de una proteína, resulta aventurado hacerlo desconociendo la incidencia de otros factores como la posible heterogeneidad en la permeabilidad o disponibilidad del PNA intracelular.

Inmunocitoquímicas y citotoxicidad de trofozoitos tratados con PNA

Como forma de evaluar si la caída en el nivel de la expresión de las diferentes proteínas resultaba en un defecto en la llegada a membrana de los factores de virulencia, se realizaron inmunocitoquímicas con anticuerpos contra CP5 y la lectina Gal/NAc. Los anticuerpos obtenidos contra CP5 se obtuvieron inmunizando conejos con un péptido de 13 aminoácidos de CP5 conjugado a BSA como acarreador. El tamaño del péptido limita los epítopes reconocibles por los anticuerpos. Los sueros de los conejos inmunizados fueron evaluados por ELISA y los anticuerpos fueron inmunopurificados en una columna con el péptido inmovilizado. El ensayo por dot blot y la distribución detectada en las inmunocitoquímicas muestran que el anticuerpo reconoce a CP5. Sin embargo los ensayos por western no mostraron que se estuviera reconociendo la proteína en lisados de amibas. Esto puede deberse a que hay epítomos que la electroforesis o la transferencia a membrana hacen imposible de reconocer por el anticuerpo. Al realizar inmunocitoquímicas de células sin tratar con PNA con los anticuerpos contra CP5, el patrón de localización de la señal fue idéntico al reportado en la bibliografía, con una distribución mayoritariamente membranal y en menor medida en gránulos citoplasmáticos. La distribución de la señal de la lectina Gal/NAc fue muy similar. Luego del tratamiento con los diferentes PNA y sus respectivos scrambled, no se detectaron diferencias de distribución ni de intensidad de la señal con ninguno de los dos anticuerpos. En el caso de la citotoxicidad, no se detectó que las células tratadas con PNA hubieran perdido significativamente su capacidad de producir lisis en una monocapa de células HeLa. Las causas de estas ausencias de efecto sobre la distribución subcelular y citotoxicidad pueden ser debidas a que sólo con el nivel mínimo de expresión sea suficiente para que las proteínas de la vía secretoria cumplan su función. Sin embargo, para el caso de Rab8 y Sec61 en que la inhibición fue mayor, los efectos esperables haciendo paralelismo con otros eucariotas serían la acumulación de producto intracelular,

y una disminución de factores de virulencia en la superficie celular con la consecuente caída en la capacidad lítica, hechos no observados. Nuevamente surge la cuestión de la posible heterogeneidad de respuesta de las amibas, o de la existencia de un mecanismo secretorio alternativo independiente de la vía clásica.

Referencias

- Ankri S, Padilla-Vaca F, Stolarsky T, Koole L, Katz U, Mirelman D. (1998) Antisense inhibition of expression of the light subunit (35kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol Microbiol* 33(2):327-337
- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis *Mol Microbiol* 28:777-785
- Bhattacharya A, Satish S, Bagchi A, Bhattacharya S (2000) The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 30:401-410
- Bhattacharya S, Bhattacharya A, Diamond LS, Soldo AE. (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool* 36:455-458
- Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M and Mirelman D. (1999) Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence *Mol Microbiol*. 34:463-472.
- Brown SC, Thomson SA, Veal JM, Davis DG (1994) NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science* 265:777-780.
- Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. (1996) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine protease genes *Mol. Microbiol* 22:255-263.
- Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas M, Tannich E. (1993) Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* DNA. *Cell Biol* 12:925-933.
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepúlveda-Amor J, Gutierrez G, Ortiz-Ortiz L (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 50 (4):412-419
- Cavalier-Smith T. (1993) Kingdom Protozoa and its 18 phyla *Microbiol Rev* 57:953-994
- Clark CG, Roger AJ, (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci* 92:6518-6521.
- Chávez-Munguía B, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A (2000) Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* *Arch Med Res* 31:S165-S167
- Cutrona G, Carpaneto EM, Ulivi M, Roncella S, Landt O, Ferrarini M, Boffa L. (1999) Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal *Nat Biotechnol* 18:300-303.
- Das P, Debnath A, Muñoz ML. (1999) Molecular mechanisms of pathogenesis in amebiasis *Indian J Gastroenterol* 18(4):161-166
- Dobell C. (1928) Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I-General introduction. II-Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitology* 20:357-412
- Doyle D, Braasch D, Simmons C, Janowski B, Corey D. (2001) Inhibition of Gene Expression Inside Cells by Peptide Nucleic Acids: Effect of mRNA Target Sequence, Mismatched Bases, and PNA Length. *Biochemistry* 40:53-64
- García-Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López MC, Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Orozco E (1999) *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33:556-568.
- Gilchrist CA, and Petri WA. (1999) Virulence factors of *Entamoeba histolytica* *Curr. Op Microbiol* 2:433-437.

- Good L, Nielsen PE. (1998a) Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci* **95**:2073-2076.
- Good L, Nielsen PE. (1998b) Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat Biotechnol* **16**:355-358.
- Gutiérrez A, Sánchez-López R, Ramos MA, Stock RP, Alagón A. (2000) Cloning of the *Entamoeba histolytica* STI3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Arch. Med. Res* **31**(4):S162-S164.
- Hanahan D (1983) Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol* **166**:557-580.
- Hubber M, Koller B, Gitler C, Mirelman D, Ravel M, Rozenblatt S, Garfinkel L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* **32**:285-296.
- Hyrup B, Nielsen PE. (1996) Peptide Nucleic Acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem* **4**:1 (5-23).
- Jacobs T, Bruchhaus I, Dandekar T, Tannich E, Leippe M, (1998) Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **27**:269-276.
- Johnson AE, van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:799-842.
- Juárez P, Sánchez-López R, Ramos MA, Alagón A. (2000) Rab8 as a molecular model of vesicular trafficking to investigate the latter steps of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **31**(4):S157-S159.
- Knudsen H, Nielsen PE. (1996) Antisense properties of duplex and triplex forming PNA. *Nucleic Acids Res* **24**:494-500.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680.
- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(17):7659-7663.
- Leippe M, Tannich E, Nickel R, van der Goot G, Pattus F, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. (1992) Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J* **11**(10):3501-3506.
- Leippe M, Andra J, Nickel R, Tannich E, Muller-Eberhard HJ. (1994) 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**(5):895-904.
- Leippe M, (1995) Ancient weapons: NK-Lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* **83**:17-18.
- Leroy A, De Bruyne G, Mareel M, Nokkaew C, Bailey G, Nelis H. (1995) Contact dependent transfer of the Galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. *Infect Immun* **63**:4253-4260.
- Martinez-Palomo A (1988) Biology of amebiasis: progress and perspectives. En: *The Biology of Parasitism*. Englund PT, Sher A (eds.) Alan R Liss, New York. pp:61-76.
- Martinez-Palomo A (1993) Parasitic amebas of the intestinal tract. En: *Parasitic Protozoa*. Kreier JP, Baker JR. (eds.) Academic Press, New York. Segunda edición, pp:65-141.
- Mellman I, Warren G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**:99-112.
- Miranda R, Salgado L M, Sánchez-Lopez R, Alagón A, Lizardi P.M. (1996) Identification and analysis of the U6 small nuclear RNA gene from *Entamoeba histolytica*. *Gene* **180**: 37-42.

- Mironov AA, Weidman P, Luini A (1997) Variations on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules *J Cell Biol* **138**(3):481-484.
- Morrison DA. (1979) Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing methods. *Methods Enzymol* **68**:327-331.
- Muñoz ML, Rojkind M, Calderon J, Tanimoto M, Arias-Negrete S, Martinez-Palomo A (1984) *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J. Protozool.* **31**(3):468-470
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchard O. (1991) Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide. *Science* **254**:1499-1500
- Nielsen PE. (1995) DNA analogues with nonphosphodiester backbones *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **24**:167-183.
- Novick P, Field C, Schekman R (1980) *Cell* **21**:205-215
- Olvera A. (1999) Inhibición de la expresión del gen SRP54 de *Entamoeba histolytica* en las cepas HK9 y HM1:IMSS, mediante el uso de oligómeros de ácidos péptido nucleicos (PNA). Tesis de Maestría IBT-UNAM.
- Palade G (1975) Intracellular on the process of protein synthesis *Science* **189**:347-358.
- Pelham HR. (1996) The dynamic organization of the secretory pathway *Cell Struct Funct.* **21**(5):413-419
- Perez-Monfort R, Ostoa-Saloma P, Velazquez-Medina L, Montfort I, Becker I (1987) Catalytic classes of proteinases of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **26**(1-2):87-97
- Petri Jr WA, Chapman MD, Snodgrass I, Mann BJ, Broman J, Ravdin JI (1989) Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **264**(5):3007-3012
- Petri WA, Ramakrishnan G. (1999) Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis *Trends Microbiol* **7**:471-473
- Petter R, Rozenblat S, Nuchamowitz Y, Mirelman D (1992) Linkage between actin and ribosomal protein L21 genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem Parasitol* **56**:329-333.
- Ramos MA, Alagón A. (2000) Molecular cloning of a gene encoding a PDI-Like protein from *Entamoeba histolytica* *Arch Med Res* **31**(4):S173-S175
- Ramos MA, Mercado GC, Salgado LM, Sanchez-Lopez R, Stock RP, Lizardi PM, Alagón A (1997) *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle *Mol Biochem Parasitol* **88**, 225-235.
- Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug SA. (1985) Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica* *J. Infect Dis* **152**(3):542-549.
- Romero, R (1993) Microbiología y parasitología humanas. *Panamericana Mexico* pp:502-508
- Rosales-Encina JL, Meza I, López de León A, Talamás-Rohana P, Rojkind M. (1989) Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica* *J Infect Dis* **156**(5):790-797.
- Rothblatt J, Novick P, Stevens T. (1994) Guidebook to the secretory pathway *London Oxford University Press. USA*
- Saavedra-Lira E, Pérez-Monfort R (1996) Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspectives in rational drug design. *Arch. Med Res* **27**:257-264.
- Sanchez-Lopez R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM, Alagon A, (1998). Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene *Mol Biochem Parasitol* **92**:355-359.

- Sanchez-Lopez R, Gutierrez A, Juarez P, Olvera A, Olvera F, Ramos MA, Sanchez R, Saralegui A, Stock RP, Alagón A. (2000) Molecular genetics of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*: An overview *Arch Med Res* **31**(4):S151-S152.
- Sanchez-Lopez R, Siminovich B, Alagón A. (2000) *Entamoeba histolytica* codes for a protein homologue of the Sec61 alpha subunit, a component of Endoplasmic Reticulum translocon *Arch Med Res* **31**(4):S168-S170.
- Scarfi S, Gasparini A, Damonte G, Benatti U (1997). Synthesis, uptake and intracellular metabolism of a hydrophobic tetrapeptide-peptide nucleic acid (PNA)-biotin molecule *Biochem Biophys Res Comm.* **236**:323-326
- Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HRB. (1990) *Cell* **61**:1349-1357
- Sepúlveda B, Martínez-Palomo A (1984) Amebiasis. En: *Tropical and Geographical Medicine*. KS Warren y AAF Mahmoud (eds). Mc Graw-Hill, New York. pp:305-318
- Smith DB, Johnson KS. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**:31-40.
- Soogard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE, Sollner T. (1994) A Rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78**(6):937-948
- Stanley SL Jr, Huizenga H, Li E. (1992) Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica* *Mol Biochem Parasitol.* **50**(1):127-138.
- Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies RJ, Schekman R (1992) *Mol Biol Cell* **3**:129-142.
- Stock RP, Olvera A, Sánchez R, Saralegui A, Scarfi S, Sanchez-Lopez R, Ramos MA, Boffa LC, Benatti U, Alagón A (2001) Inhibition of gene expression in *Entamoeba histolytica* with antisense peptide nucleic acid oligomers. *Nat Biotechnol* **19**:3231-234
- Tannich E, Horstmann RD (1992) Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Mol Evol* **34**:272-273
- The QIAexpressionist (1997) A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins QIAGEN 03/97.
- Torres-Guerrero H, Peattie DA, Meza I. (1991) Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **45**:121-130
- Uhlmann E, Peyman A. (1990) Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem. Rev.* **90**:544.
- Willhoeft U and Tannich E (1999) The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **99**:41-53
- Wittun P, Nielsen PE, Buchardt O, Egholm M, Norden B (1994) Double helix formation by complementary PNA direct observation of helical seeding *Nature* **368**:561-563.



Inhibition of gene expression in *Entamoeba histolytica* with antisense peptide nucleic acid oligomers

Roberto P Stock¹, Alejandro Olvera¹, Ricardo Sánchez¹, Andrés Saralegui¹, Sonia Scarfi², Rosana Sanchez-Lopez¹, Marco A Ramos¹, Lidia C. Boffa³, Umberto Benatti² and Alejandro Alagón^{1*}

Peptide nucleic acids (PNAs) may be a potent tool for gene function studies in medically important parasitic organisms, especially those that have not before been accessible to molecular genetic knockout approaches. One such organism is *Entamoeba histolytica*, the causative agent of amoebiasis, which infects about 500 million people and is the cause of clinical disease in over 40 million each year, mainly in the tropical and subtropical world. We used PNA antisense oligomers to inhibit expression of an episomally expressed gene (neomycin phosphotransferase, NPT) and a chromosomal gene (EhErd2, a homolog of Erd2, a marker of the Golgi system in eukaryotic cells) in axenically cultured trophozoites of *E. histolytica*. Measurement of NPT enzyme activity and EhErd2 protein levels, as well as measurement of cellular proliferation, revealed specific decreases in expression of the target genes, and concomitant inhibition of cell growth, in trophozoites treated with micromolar concentrations of unmodified antisense PNA oligomers.

Although antibiotics have had a profound impact on morbidity and mortality due to bacterial disease since their introduction 50 years ago, those conditions caused by protozoan parasites have been affected to a much lesser degree. Protozoan infections remain one of the largest unresolved problems of world health¹. The difficulties arise mainly from the complexity of protozoan parasite biology. Parasite life cycles, with their often drastic morphological and metabolic changes, and the frequently unusual biochemistries that characterize them, have defied most efforts aimed at the elucidation of the factors that determine the nature of the relationship between the parasite and its possible hosts. Tools for probing the function of specific parasite genes, their biology, and the host-parasite relationship, are sorely needed in parasitology.

With these considerations in mind, we evaluated the potential of PNA oligomers to selectively downregulate gene expression in the protozoan pathogen *E. histolytica* to determine their utility as tools for gene function studies. PNAs are polynucleotide analogs in which the entire phosphate-sugar backbone has been replaced by an isomeric pseudo-peptidic chain to which the four bases are linked. PNAs have been shown to bind complementary natural polynucleotide sequences with higher affinity than their natural counterparts, partially as a result of the extreme flexibility and neutrality of the artificial backbone. Furthermore, because proteases and nucleases do not recognize their artificial structure, PNAs are exceptionally stable in biological environments (as reviewed in ref. 2). PNA oligomers have been used in the last few years as antisense and anti-gene agents in a variety of cell-free and cellular systems, showing that they can effectively and selectively downregulate gene expression when used at micromolar concentrations (reviewed in ref. 3). The transcription and translation inhibitory properties of PNA oligomers are determined by length composition (notably purine:pyrimidine ratio) and, critically in cellular systems, permeability of target cells². In the case of mammalian cells, the limited permeability of the cell membrane to PNA has led to the develop-

ment of appropriate transport signals that, when covalently linked to the oligomer, increase transport across the cell membrane and/or delivery into cell nuclei³⁻⁶. In *Escherichia coli*, the use of strains of different permeability has revealed that the efficacy of inhibition is determined by the entry of PNA into the cells^{3,8}.

Our group is concerned with the study of the biology of *E. histolytica*, an unusual eukaryote in terms of its metabolism and cellular architecture⁹⁻¹¹. However, the difficulties inherent in the cultivation of *E. histolytica* trophozoites and the lack of procedures for deletion of genes have made it very difficult to perform classical genetic studies aimed at the characterization of phenotypes resulting from gene inactivation¹². Several features of trophozoites (the metabolically active pathogenic stage) are critical for molecular genetic manipulation: (1) trophozoites in axenic culture cannot be grown sustainably at high density in defined medium¹³; (2) they do not possess a sexual cycle¹⁴; (3) cells in axenic culture exhibit a variable number of nuclei (commonly one to two, more rarely three or more)¹¹ and a variable DNA content¹⁵; and (4) they have a complex ploidy that, in a recent study, has been estimated to be at least four¹⁶.

Only recently, antisense strategies using plasmids transcribing antisense messenger RNAs (mRNAs) have been successfully used allowing downregulation of specific genes and the analysis of resulting phenotypes in *E. histolytica*^{17,18}. The methodology used, however, requires the genes under study to be cloned and transfected into cells, maintained episomally by selection at universal copy numbers and expressed by use of *Entamoeba* control elements of which our knowledge is still very limited¹².

In this study, we report the use of PNA oligomers as antisense agents for effective and specific downregulation of expression of two genes, one episomal and the other chromosomal (NPT and EhErd2 respectively) in *E. histolytica* in culture. We reasoned that downregulation of NPT expression, and therefore the ability to detoxify G-418, under antibiotic selection should reduce the growth of trophozoites, indicating that they were permeable to PNA. The EhErd2 gene,

¹Instituto de Biotecnología/UNAM, Av. Universidad 2001, 62210 Morelia, Mexico; ²Institute of Biochemistry, University of Genoa, Viale Benedetto XV, 1-16132, Italy; ³National Cancer Institute, IST, Largo R. Benzi, 15132 Genoa, Italy. *Corresponding author (alagon@ibt.unam.mx).

RESEARCH ARTICLE

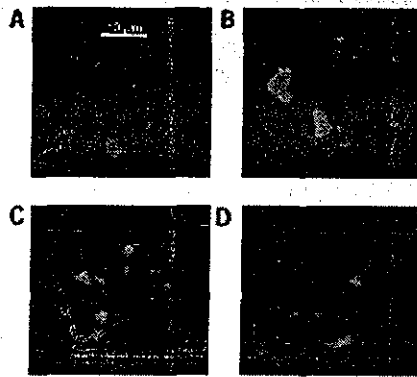


Figure 1. Distribution of antisense biotinylated PNAs in trophozoites of strain HK9 after 2 h (A,B) and 24 h (C,D) incubation with 20 μ M PNA. Confocal image representative of numerous studies with PNAs of different lengths and composition (from 13- to 20-mer) shows a diffuse cytosolic distribution with large areas of high concentration apparent after 2 h of incubation (in green, corresponding to Alexa 488-streptavidin), which tend to condense by 24 h, with no detectable signal in the nucleus (propidium iodide, red). Most cells were thin permeable, and a variable degree of sequestration in vesicles was also observed.

which is a homolog of a Golgi membrane receptor described in mammalian and yeast cells²⁰, was used to determine whether antisense inhibition of chromosomal genes is also achievable in the same PNA concentration range. An effect on cellular proliferation could be also reasonably expected, in that *Erd2* deletion in *Saccharomyces cerevisiae* has been shown to be very deleterious, possibly even lethal, presumably because of its crucial role in the maintenance of endoplasmic reticulum function¹⁶. In contrast to mammalian cells *E. histolytica* is permeable to unmodified PNA and inhibition of gene expression is significant and easily achieved in a dose-dependent manner saving the work of cloning, transfection, and selection procedures needed for plasmid-mediated antisense inhibition. In addition, PNAs coupled to appropriate signals have been recently shown to be effective gene downregulators in an animal system with no evidence of toxicity²¹. Together with our findings, these studies indicate the potential of PNA as a gene downregulator *in vivo* to probe the molecular genetic foundations of *E. histolytica* parasitism directly in animal models.

Results and discussion

Permeability of trophozoites to PNA. Figure 1 shows a maximum-intensity projection of HK9 trophozoites after a 2 h (Fig. 1A,B) and 24 h (Fig. 1C,D) exposure to a 20 μ M of a biotinylated antisense PNA directed against the first nucleotides of the NPT gene. The distribution of PNAs (green) after 2 h shows a clear uptake by the cells with fluorescence restricted to the cytosol, partly in a diffuse pattern with areas of high concentration and partly concentrated in what possibly are endocytic vesicles. At 24 h the distribution remains cytosolic and seems to concentrate in what appear to be small vesicles. No PNA could be observed within the nucleus (red). We have tested permeability of trophozoites to PNA with an extensive battery of 13-, 17-, 18- and 20-mers, biotinylated and directly coupled to rhodamine, and all have shown similar patterns of entry and accumulation inside both HK9 and HM-1:IMSS trophozoites (data not shown).

Neomycin phosphotransferase activity in PNA-treated trophozoites. Transfected cells grown in 5 ml cultures in the presence of 10 μ g/ml G418 in anaerobiosis were incubated with 20 μ M NEO17ATG (experimental) or NEO17SCR PNA (scrambled control) and collected at 96 h. Lysates were obtained as described in the

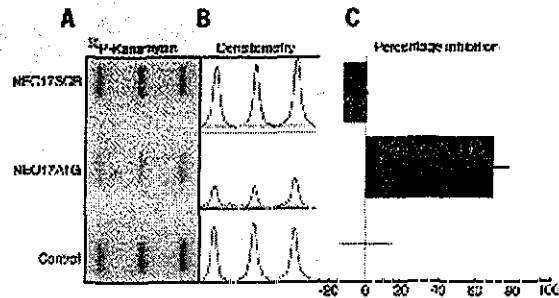


Figure 2. Neomycin phosphotransferase activity of lysates of HK9 trophozoites treated with 20 μ M NEO17ATG antisense PNA for 96 h. For comparison, 20 μ M NEO17SCR is a random PNA of identical base composition. (A) Autoradiogram of slot blot of ³²P-labeled kanamycin. (B) Densitometry of autoradiogram in (A). (C) Percentage inhibition \pm s.d. of triplicate samples (by comparison to untreated control).

Experimental Protocol, and identical quantities of total protein were used for a kanamycin phosphorylation assay. A typical autoradiogram of the slot blot assay of HK9 cells grown for 96 h in the presence of antibiotic is shown in Figure 2A. Two-dimensional densitometry (Fig. 2B) revealed that inhibition of NPT activity was 70% (Fig. 2C) and was sequence-specific, because the random PNA of identical base composition did not give significant inhibition. Results of the densitometry readings are plotted as percentage inhibition of NPT activity with respect to untreated controls. This level of inhibition is comparable to that recently reported for amoebapore and the light chain of the Gal-NAc lectin genes, downregulated by means of antisense mRNA transcription from plasmids^{17,18}.

EhErd2 protein expression in PNA-treated trophozoites. Cultures of exponentially growing trophozoites were incubated with a 17-mer antisense complementary to the first 17 coding nucleotides of the EhErd2 mRNA (ERD17ATG) or its random control (ERD17SCR). Protein expression was measured by western blot of cellular lysates (Fig. 3A), protein concentration was normalized and identical quantities loaded onto 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and immunoblotted. Densitometry of duplicate samples revealed a 35% specific decrease in EhErd2 protein expression at an antisense PNA concentration of 10 μ M after 96 h of incubation (Fig. 3). No significant decrease in EhErd2 expression was seen in cells treated with the random PNA.

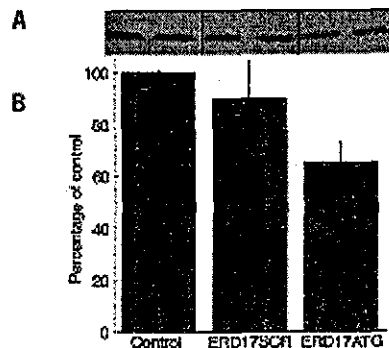


Figure 3. EhErd2 protein levels in lysates of HK9 trophozoites treated with 10 μ M ERD17ATG antisense PNA for 96 h. (A) Western blot of EhErd2. (B) Percentage inhibition by densitometry (by comparison to untreated control).

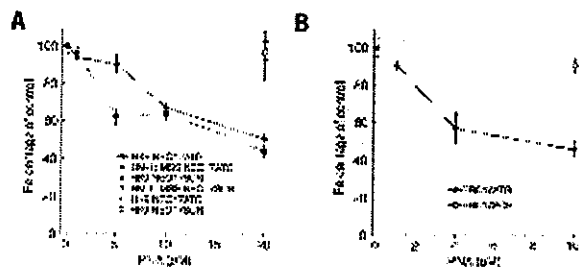


Figure 4. Effect of PNA treatment on trophozoite growth. (A) Treatment with anti-NPT PNA. Identical inocula of pTCV4-transformed HK9 (solid line) or HM-1:IMSS (dashed line) trophozoites were cultured in medium with 10 µg/ml G418 with varying concentrations of NEO17ATG or NEO17SCR PNA (triangles). The open symbols represent pTCV4-transformed HK9 trophozoites grown without antibiotic and treated with 20 µM NEO17ATG or random control PNA. (B) Treatment with anti-EhErd2 PNA. Identical inocula of HK9 trophozoites were cultured in standard medium with varying concentrations of ERD17ATG (solid circles) or ERD17SCR (open square). Viable cells were counted 96 h post-addition of PNA and proliferation plotted as percentage of untreated (control) cultures. The error bars represent the standard deviation of the mean of triplicate determinations.

Proliferation of PNA-treated cells. Triplicate cultures of trophozoites were incubated with PNA NEO17ATG at concentrations ranging from 1 to 20 µM in the presence of G418 at 10 µg/ml in standard medium. Trophozoites were counted at 96 h and percentage growth (with respect to untreated cultures) plotted against concentration of PNA (Fig. 4A). The 17-mer antisense PNA inhibited trophozoite proliferation in a dose-dependent manner, whereas the corresponding random PNA did not. The effect of the antisense 17-mer PNA was significant, with proliferation inhibited by 55% at a concentration of 20 µM. No evidence of antiproliferative activity was observed in transfected cells not undergoing antibiotic selection, in which a decrease in expression of NPT would not be expected to affect trophozoite growth (Fig. 4A, open symbols). When trophozoites were treated with ERD17ATG PNA (Fig. 4B), a similar dose-dependent effect on proliferation was observed, which correlated closely to the level of inhibition of EhErd2 levels at 96 h of incubation. The corresponding random PNA (ERD17SCR) did not affect cell growth.

Although PNA uptake is evident, as measured by high-resolution confocal microscopy, inhibition of proliferation at 96 h is 55% for Neo and 53% for Erd2 antisense PNAs. Our hypothesis is that, because multinucleated *Entamoeba* cells are common²⁴ mRNA levels likely vary widely from cell to cell. Thus the 55% inhibition of proliferation by NEO17ATG and the 53% inhibition by ERD217ATG probably reflect averages of cell populations in which inhibition is high and populations in which inhibition is significantly lower as a result of higher levels of NPT or Erd2 mRNA. Studies done at the single-cell level, by microscopy or flow cytometry, should provide valuable phenotypic information at various levels of inhibition of gene expression. These levels of inhibition may well be biologically significant. In that Bracha and coworkers have found that a 60% decrease in amoebapore expression (by antisense mRNA expression) resulted in 90% decrease in cytopathic activity of viable trophozoites²¹ Our laboratory is actively engaged in improving these levels of inhibition by design of appropriate transport signals for coupling to the PNA oligomers.

Taken together, our results suggest that PNA oligomers may provide a valuable tool for genetic studies in *E. histolytica*, and may possibly be of use in the study of other organisms for which the tools necessary for gene knockout and reverse genetics are not available, as

is the case for a large portion of pathogenic protozoans of particular importance in the tropical and subtropical world. PNA oligomers can be manually synthesized and purified in the laboratory on scales needed for *in vitro* and small-animal *in vivo* work. As shown for antisense agents in mammalian cells, appropriate signals and/or delivery systems (such as liposomes) may be designed to improve PNA delivery into *E. histolytica* cells, as well as for nuclear localization for studies on transcriptional inhibition of gene expression.

Experimental protocol

Cells and culture. All experiments were done using the HK9 and HM-1:IMSS strains. Results were equivalent in both strains in all cases. Cells were grown in TY-S medium supplemented with 15% newborn calf serum¹³ in sealed culture tubes or, in the case of cultures in microtiter slides, in an anaerobic incubator (Forma Scientifica, Marietta, OH) with a gas mixture composed of N₂:H₂:CO₂ (90:5:5) at 37°C.

PNA synthesis, modification, and quality control. PNA oligomers were synthesized manually using solid phase synthesis (SPSS) by Boc chemistry using appropriate resins²². Biotinylation of part of the synthesis products for permeability studies was done before the final cleavage. From the resin, synthesis products were separated by reverse phase on a preparative column using a linear 0–60% acetonitrile gradient in 0.1% trifluoroacetic acid in water. Peaks were analyzed in a Hewlett-Packard mass spectrometer fitted with an electrospray apparatus (Harvard Instruments, Millis, MA). The high performance liquid chromatography (HPLC) fractions corresponding to the complete synthesis product were dried and stored at 4°C. Purity of the oligomers was >95% by HPLC. Working stock solutions of PNA were prepared in sterile water at a concentration of 1 mM. PNAs synthesized were 17 mers complementary to the first 17 nucleotides of NPT mRNA coding sequence (NEO17ATG) or the EhErd2 mRNA (ERD17ATG) designed for antiparallel hybridization (the 3' end of the PNA corresponding to the amidated C terminus). As controls scrambled sequences of identical composition to each antisense oligomer were synthesized. The PNA oligomers synthesized complementary to NPT mRNA were as follows: for NEO17ATG, CONH₂-TACTAACTTGTTCTACC-NH₂; for NEO17SCR, CONH₂-CATATATCTTGFACTCT-NH₂. The PNAs complementary to EhErd2 mRNA were as follows: for ERD17ATG, CONH₂-TACCACAAAITAGAAAA-NH₂; for ERD17SCR, CONH₂-CAATACATAAGTAACA-NH₂.

Cytochemistry and fluorescence microscopy. Trophozoites grown on tissue culture slides were fixed at 2 and 24 h after addition of biotinylated PNA at 20 µM final concentration. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in 50 mM L-lysine for 20 min at room temperature, washed four times with PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Kodak) in PBS and blocked with 5% nonfat milk (Nestlé, Vevey, Switzerland) in PBS for 1 h. Streptavidin-Alexa 488 (at 1 µg/ml; Molecular Probes, Eugene, OR) was added to the fixed and blocked cells and incubated at room temperature for 90 min. Cells were washed extensively and counterstained with 2 µg/ml propidium iodide (Molecular Probes). Samples were mounted in Prolong antifade mounting medium (Molecular Probes) and observed in a Bio Rad MRC600 system (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) fitted to a Zeiss Axioskop. Optical slices were collected using the two available fluorescence channels and appropriate filter blocks. The confocal data sets were collected with a 100× numerical aperture, 1.3 Plan Neofluar Oil immersion lens and 180 nm z-step slices are projected with the maximum intensity algorithm. Untreated control and streptavidin-Alexa 488 stained preparations not exposed to biotinylated PNA showed no signal at the sensitivity and laser power settings used.

Cell transfection and vectors. *E. histolytica* trophozoites growing exponentially were transfected using Efficient Lipofection Reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) as instructed by the manufacturer, with the exception that lipofection was done in OptiMem (Gibco BRL, Grand Island, NY). Transformants were selected with increasing amounts of G418 (Geneticin; Sigma, St. Louis, MO) and proliferation and NPT activity experiments were done with trophozoites growing in medium containing 10 µg/ml antibiotic, corresponding to a resistance index of 4. The vector used in these experiments called pTCV4 is a minimized derivative of the pTCV1 plasmid²².

Measurement of NPT activity. Neomycin phosphotransferase activity was measured in cell extracts obtained from PNA-treated and control cul-

RESEARCH ARTICLE

tures by a slot blot assay using kanamycin as substrate for phosphorylation²⁴. Briefly, trophozoites were harvested at each time point, washed, counted, and resuspended at 2×10^6 cells/ml in 50 mM Tris HCl pH 7.5 with 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM EDTA, freeze thawed three times using liquid nitrogen and cleared by centrifugation. Protein concentration was normalized for all samples (BCA method Pierce Chemical Co., Rockford, IL). NPT activity was routinely measured in triplicate for each treatment and time point by adding 1.25 µg of lysate protein to an excess kanamycin and [³²P]-ATP and incubating for 1 h. The amount of radioactive kanamycin was measured either by cutting the spots on the membranes and counting radioactivity in a scintillation counter (Beckman Instruments, Fullerton, CA) or alternatively, by autoradiography in a PhosphorImager system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and two dimensional densitometric analysis with the software package NIH Image version 1.62. Results are plotted as percentage inhibition with respect to control activity \pm s.d. of triplicate determinations.

Measurement of EhErd2 expression. Expression of EhErd2 was measured by quantitative western blot of trophozoite lysates. Untreated cultures were used as control. Briefly, 96 h of incubation with antisense or random PNA, trophozoites were harvested, washed, counted, resuspended at 2×10^6 cells/ml in PBS, lysed in SDS-PAGE, and protein concentration determined as for the NPT activity assay. Identical amounts of lysate protein were loaded onto 15% SDS-PAGE gels separated electrophoretically, and

transferred onto Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked, incubated with anti EhErd2 rabbit antibody (at 1 µg/ml), and developed with a goat anti rabbit alkaline phosphatase antibody conjugate (Zymed, S. San Francisco, CA) and BCIP/NBT (Zymed). Densitometry was done using the NIH Image 1.62 software package. Results are plotted as percentage inhibition with respect to control levels \pm s.d. of duplicate determinations.

Measurement of trophozoite proliferation. Proliferation of PNA-treated and control trophozoites was measured, in triplicate 5 ml cultures in medium supplemented with 10 µg/ml G418 when appropriate, for each time point by direct counting using a hemocytometer (Neubauer, Hauser Scientific, Hoeham, PA) and Trypan Blue.

Acknowledgments

This work was supported in part by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) grant 27826-N (Mexico), Dirección General de Asuntos del Personal Académico grant 207097 (Mexico), a collaboration travel grant from the Centro Nazionale per la Ricerca (Italy) and CONACyT (Mexico). We wish to thank Angeles Gutiérrez, Xóchitl Álvarez, Enrique Milla, Gianluca Damonte and Drs. Paul Lizardi, Mario Zurita and Eduardo Harjales.

Received 22 May 2000; accepted 18 December 2000

- Bloom, B. & Cerami, A. Bioterrorism: science and the third world, under the volcano. *Ann. NY Acad. Sci.* 669: 38–44 (1999).
- Hyrup, B. & Nielsen, P. Peptide nucleic acids (PNA), synthesis, properties and potential applications. *Bioorg. Med. Chem.* 1, 9–23 (1996).
- Scoones, U., Halbrink, M. & Langel, U. Antisense properties of peptide nucleic acids. *Front. Biosci.* 4: D782–786 (1999).
- Pooqa, M. et al. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16: 857–861 (1998).
- Branden, L.J., Mohamed A.J. & Smith, C.I. A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nat. Biotechnol.* 17: 794–797 (1999).
- Cultroni, G. et al. Effects in live cells of a c-myc anti-gene PNA linked to a nuclear localization signal. *Nat. Biotechnol.* 18: 300–303 (2000).
- Good, L. & Nielsen, P.E. Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2073–2076 (1998).
- Good, L. & Nielsen, P.E. Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat. Biotechnol.* 16: 355–358 (1998).
- McLaughlin, J. & Aley, S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *Protozoology* 32: 221–240 (1985).
- Bakker-Grunwald, T. & Wöselmann, C. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today* 9: 27–31 (1993).
- Bhattacharya, A., Salish, S., Bagchi, A. & Bhattacharya, S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 30: 401–410 (2000).
- Petri, W.A. & Ramakrishnan, G. Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Trends Microbiol.* 7: 471–473 (1999).
- Diamond, L.S., Hatlow, D.R. & Curwick, C.C. A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72: 433–432 (1978).
- Martinez-Palomo, A. The biology of *Entamoeba histolytica* (John Wiley & Sons, Chichester, England, 1992).
- López-Revilla, R. & Gomez, R. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens* and *E. moeshoryskii*: fluctuation of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* 44: 243–248 (1978).
- Wilhoell, U. & Tannirich, E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98: 41–53 (1999).
- Bracha, R., Nachamowitz, Y., Leippe, I.A. & Mirelman, D. Antisense inhibition of amebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 34: 463–472 (1999).
- Ariki, S. et al. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNAc lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol. Microbiol.* 33: 327–337 (1999).
- Seneroz, J.C., Hardywick, K.G., Dean, N. & Petham, H.R.B. ERD2, a yeast gene required for the receptor mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61: 1349–1357 (1990).
- Sanchez-Lopez, R. et al. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* Erd2 gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92: 355–359 (1990).
- Tyler, B.M. et al. Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7053–7058 (1999).
- Giovine, M. et al. Synthesis and characterization of a specific peptide nucleic acid that inhibits expression of inducible NO synthase. *FEBS Lett.* 426: 33–38 (1998).
- Dhar, S.K., Vires, R.R., Bhattacharya, S. & Petri, W.A. Ribosomal DNA fragments enhance the stability of transfected DNA in *Entamoeba histolytica*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45: 658–660 (1998).
- Platt, S.G. & Yang, N.S. Dot assay for phosphotransferase activity in crude cell extracts. *Anal. Biochem.* 162: 529–535 (1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN