



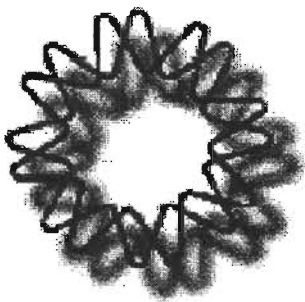
00591

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

ACIDOS PEPTIDO NUCLEICOS (PNA) COMO AGENTES
SUPRESORES DE LA EXPRESION GENICA EN *Entamoeba*
histolytica.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A:
RICARDO SANCHEZ PEREZ



CUERNAVACA, MORELOS

2005

m.341205



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



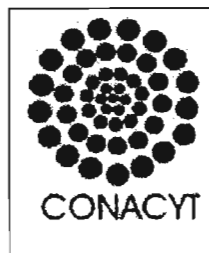
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA PRESENTE TESIS SE REALIZO EN LOS LABORATORIOS DE LOS DRS.
ROBERTO STOCK Y ALEJANDRO ALAGON EN EL DEPARTAMENTO DE
MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS DEL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO, CUERNAVACA, MOR. BAJO LA DIRECCION DEL DR. ROBERTO
STOCK.



DURANTE MIS ESTUDIOS FUI BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE
CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) Y DE LA DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP) DE LA UNAM.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LOS PROYECTOS
CONACyT 27826-N
CONACyT 33079-N
DGAPA IN208400
DGAPA 208400
DGAPA 207097
IN-225998

A mis Padres, Ricardo y Blanca

A mis hermanas, Marcela y Melissa

A Mónica

A Roberto Stock por dirigir excelentemente y apoyar incondicionalmente este proyecto de principio a fin.

A Alejandro Alagón por su gran apoyo personal y académico durante mi estancia en su laboratorio.

A Mario Furita y Luis Miguel Salgado por sus comentarios y sugerencias durante los tutoriales de este proyecto.

A mis sinodales Ruy Pérez Tamayo, Lourival Possani, Carlos Arias, Federico Sánchez, Enrique Reynaud, Rebeca Manning y Alejandro Alagón, por sus acertados comentarios.

Al personal del bioterio por su apoyo técnico.

Al personal de docencia por su apoyo en todos los trámites administrativos.

A Olegaria Benitez y Ricardo Mondragón por su apoyo técnico y laboratorista.

A Angélica Linares por su apoyo administrativo en el laboratorio.

A Andrés Saralegui por su apoyo técnico en el microscopio confocal.

A Alejandro y Felipe Olvera por su apoyo técnico en el laboratorio.

*A Alfonso Olivos y Augusto González, por su amistad y apoyo técnico con los ensayos *in vivo* y los anticuerpos contra ambaporo.*

A los italianos Carlo, Sonia, Gianluca, Enrico y Rafael, por dar una mano en la síntesis, purificación y caracterización de los PNAs. A Massimo, Christina y Francesco por su amistad y confianza ilimitada.

A mis compañeros del laboratorio: Mónica, Rosana, Blanca, Felipe, Herli, Gocu, Pichón, Saucedo, Laura, Judith, Angélica y al tocayo.

A la plebe del instituto.

INDICE

Abreviaturas	i
Indice de figuras	iii
Indice de tablas	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCION	1
<i>Entamoeba histolytica</i>	2
Biología.....	2
Ciclo de vida.....	2
Bioquímica.....	3
Genoma.....	3
<i>Entamoeba histolytica</i> como un eucariote minimizado.....	4
Amibiasis y factores de virulencia.....	4
Vía secretoria de <i>Entamoeba histolytica</i>	5
Degradación de proteínas por el proteasoma en <i>Entamoeba histolytica</i>	6
Inhibición de la expresión génica en <i>Entamoeba histolytica</i>	6
Transporte y secreción.....	8
Generalidades.....	8
La vía secretoria en eucariotes.....	9
Degradación de proteínas por el proteasoma.....	11
Supresión génica.....	13
Generalidades.....	13
Análogos.....	14
Acidos péptido nucleicos (PNA).....	15
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	21
Elección de las secuencias de los PNAs.....	22
Síntesis de PNAs.....	23

Síntesis básica.....	23
Derivatizaciones.....	24
Purificación y caracterización de PNAs.....	26
Secuencias de los PNAs sintetizados.....	27
Secuencia de los genes blanco y sitio de hibridación de los PNAs.....	29
Células.....	30
<i>Entamoeba histolytica</i>	30
<i>E. coli</i>	30
Proteínas recombinantes.....	31
Clonación.....	31
Expresión.....	32
Purificación.....	32
Producción de anticuerpos policlonales.....	33
Purificación de anticuerpos policlonales.....	35
Caracterización de los anticuerpos policlonales.....	36
Western Blot cualitativo.....	36
Imunocitocalización.....	37
Anticuerpos anti-Sec61, anti-CP5 y anti-amibaporo.....	38
Ensayos de permeabilidad de los PNAs.....	39
Ensayos de la proliferación de trofozoítos.....	40
Medición de los niveles de proteína de trofozoítos.....	41
Medición de proteína (BCA).....	41
Western Blot cuantitativo.....	41
Transcripción <i>in vitro</i>	42
Producción de transcritos de Sec61 para los ensayos de traducción <i>in vitro</i>	42
Producción de transcritos biotinilados de Sec61 para los ensayos de cinética de hibridación en fase sólida (Biacore).....	42
Ensayos de cinética de hibridación en fase sólida (Biacore).....	44
Purificación de ARN poli (A) de amiba.....	45
Purificación del ARN de EhSec61 de amiba.....	46
Traducción <i>in vitro</i>	47

Autorradiografía-Densitometría.....	47
Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).....	47
Medición de la incorporación de Met [S ³⁵] en material precipitable.....	47
Estudios de FACs.....	48
Mediciones de la Tm de híbridos PNA/ADN.....	49
Formación de abscesos hepáticos en hámster.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES	51
Síntesis y caracterización de ácidos péptido nucleicos (PNA).....	52
Permeabilidad de PNAs a trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	55
Ensayos de la proliferación y niveles de proteína de trofozoítos.....	58
Ensayos con PNA sin modificar.....	58
Ensayos con PNAs modificados.....	60
Ensayos de inhibición de la traducción in vitro con PNA.....	67
Ensayos de cinética y estabilidad de híbridos PNA/ADN.....	72
Determinación de las Tm (estabilidad de híbridos).....	72
Ensayos de Biacore (cinética de formación de híbridos).....	75
Ensayos de la localización de factores de virulencia (Amibaporo y Cisteína proteasa 5) en trofozoítos.....	78
Estudios de formación de abscesos hepáticos en hámster.....	80
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	84
REFERENCIAS	86
Anexo 1. Stock R, Olvera A, Scarfi S, Sánchez R, Ramos MA, Boffa L, Benatti H, Landt O, Alagón A. (2000). Inhibition of neomycin phosphotransferase expression in <i>Entamoeba histolytica</i> with antisense peptide nucleic acid (PNA) oligomers. <i>Arch. Med. Res.</i> 31:271-272.....	95
Anexo 2. Stock R, Olvera A, Sánchez R, Saralegui A, Scarfi S, Sánchez-López R, Ramos MA, Boffa L, Benatti H, Alagón A. (2001). Inhibition of gene expression in <i>Entamoeba histolytica</i> with antisense peptide nucleic acid oligomers. <i>Nat. Biotechnology.</i> 19: 231-234.....	98
Anexo 3. Sánchez R, Alagón A, Stock R. (2002). <i>Entamoeba histolytica</i> : intracellular distribution of the proteasome. <i>Exp. Parasitol.</i> 3-4:187-190.....	103
Anexo 4. Sánchez R, Saralegui A, Olivos-García A, Scapolla C, Damonte G, Sanchez-Lopez R, Alagón A, Stock R. (2004). <i>Entamoeba histolytica</i> : Intracellular distribution of the Sec61 α subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids. <i>Exp. Parasitol.</i> In Press.....	108

Abreviaturas

A	Adenosina
ABTS	2-2'-Azino-di-[3-etilbenzoliazo-lino sulfonato (6)] diamino
ADN	Acidos desoxirribonucleicos
ARN	Acidos ribonucleicos
ATG	Antisentido
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Biotina
BLAST	Herramienta para la búsqueda de comparaciones basada en alineamientos locales
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Citosina
°C	Grados centígrados
Cys	Cisteína
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletanolamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
E64	N-[N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina
EDTA	Acido etilendiamino tetra-acético
EM	Espectroscopía de masas
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>et al.</i>	<i>et alos</i> , y colaboradores
G	Guanosina
g, mg, µg, ng	Gramo, miligramo, microgramo, nanogramo
HATU	o-(7-azabenzotriazol-1-y1)-1,1,3,3-tetrametiluronium hexafluorofosfato
HCl	Acido clorhídrico

HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
h, min, seg	Hora, minutos, segundos
K	Lisina
KDa	Kilodalton
L, mL, μ L	Litro, mililitro, microlitro
MBHA	Metilbenzidrilamina
M, mM, μ M, nM	Molar, milimolar, micromolar, nanomolar
MPM	Marcador de peso molecular
N ₂	Nitrógeno
NMP	N-Metilpirrolidona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNA	Acido Péptido Nucleico
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SCR	<i>Scrambled</i>
T	Timidina
TA	Temperatura ambiente
tBoc	Tert-butiloxilcarbonil
TFA	Acido trifluoroacético
TFMSA	Acido trifluorometanosulfónico
Tm	Temperatura de desnaturalización
Δ Tm	Cambio en la temperatura de desnaturalización
U	Unidades enzimáticas
uma	Unidad de masa absoluta
uma	Unidades de masa atómica
V	Voltios
vol	Volumen
Xg	Número de veces la fuerza de la gravedad (unidades de centrifugación)

Índice de figuras

Figura 1.	Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> vistos por contraste de fases.....	2
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	2
Figura 3.	Microscopía electrónica de un trofozoíto de <i>E. histolytica</i>	4
Figura 4.	Esquemización de una vía secretoria eucariota típica.....	9
Figura 5.	Organización estructural del proteasoma.....	11
Figura 6.	Sistema de degradación de proteínas Ubiquitina/Proteasoma.....	12
Figura 7.	Inhibición de la expresión génica.	14
Figura 8.	Esquemización de los tres grupos de análogos sintetizados.....	15
Figura 9.	Estructura química de un péptido, PNA y una molécula de ADN....	15
Figura 10.	Dependencia de la fuerza iónica sobre la estabilidad térmica (Tm) de dúplex de PNA/ADN y ADN/ADN.....	17
Figura 11.	Representación esquemática de la síntesis de PNA en fase sólida.....	24
Figura 12.	Región 5' de los genes EhS2, EhSec61 y EhS α	29
Figura 13.	Cromatograma de HPLC preparativo representativo de las síntesis crudas de PNAs.....	53
Figura 14.	Espectro de masas representativo de las síntesis de PNAs.....	54
Figura 15.	Cromatograma de HPLC analítico representativo de las síntesis de PNAs.....	54
Figura 16.	Permeabilidad relativa de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a 17-meros de PNA sin modificar y modificados con miristato.....	56
Figura 17.	Comparación de la permeabilidad de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a PNAs 17-meros sin modificar y modificados con miristato y palmitato.	56
Figura 18.	Distribución subcelular del B-K-PNA-miristato en trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	57
Figura 19.	Inhibición de la proliferación en trofozoítos tratados con PNAs contra EhS2.	59
Figura 20.	Inhibición de la proliferación y expresión de EhS α en trofozoítos tratados con PNAs.	59
Figura 21.	Inhibición de la proliferación y expresión de EhSec61 en trofozoítos tratados con PNAs sin modificar.	60
Figura 22.	Proliferación de trofozoítos tratados con 1 y 10 μ M de los ácidos mirístico y palmítico.....	60
Figura 23.	Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados.	61
Figura 24.	Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal.....	62
Figura 25.	Capacidad reductora del medio condicionado de amibas.....	63
Figura 26.	Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs reducidos y sin reducir.	64
Figura 27.	Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal con cistina (Cys ₂), 1,2-diaminoetano (linker) y miristato (C14).	65

Figura 28. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal con hexanoato y decanoato....	66
Figura 29. Incorporación de Met [³⁵ S].	67
Figura 30. Traducción <i>in vitro</i> del ARNm de luciferasa.	68
Figura 31. Correlación entre la densitometría (gel) y la precipitación con TCA de la traducción <i>in vitro</i> del ARNm de luciferasa.....	68
Figura 32. Purificación de ARN poli (A) total de amiba.....	69
Figura 33. Incorporación de Met ³⁵ S.	69
Figura 34. Traducción <i>in vitro</i> de ARNm total de amiba.	70
Figura 35. Vectores de transcripción <i>in vitro</i> de EhSec61.	71
Figura 36. ARN de EhSec61 transcrito <i>in vitro</i>	71
Figura 37. Determinación de la T _m de los complejos PNA/ADN.	72
Figura 38. Correlación entre la estabilidad del híbrido (T _m) y porcentaje de inhibición de PNAs no derivatizados con ácidos grasos.....	74
Figura 39. Correlación entre la estabilidad del híbrido (T _m) y porcentaje de inhibición de conjugados de PNA con ácidos grasos.....	74
Figura 40. Vector de transcripción para la producción de ARN para los ensayos de Biacore.	75
Figura 41. Gráfica representativa de los <i>sensogramas</i> corregidos de la cinética de hibridación de PNA/ADN.	76
Figura 42. Correlación entre la cinética de hibridación (KD) y estabilidad del híbrido (T _m).	77
Figura 43. Correlación entre la cinética de hibridación (KD) y estabilidad del híbrido (T _m).	77
Figura 44. Localización a nivel de membrana plasmática de proteasa de cisteína 5 y amibaporo.	79
Figura 45. Cuantificación por citometría de flujo a nivel de membrana plasmática de proteasa de cisteína 5 y amibaporo.	79
Figura 46. Fotografía de los hígados de los hámsters.	81

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencia y modificaciones de los PNAs sintetizados.	27
Tabla 2. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales específicos contra EhS α en conejo.....	33
Tabla 3. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales específicos contra EhS2 en conejo.....	33
Tabla 4. T _m obtenidas de los híbridos PNA/ADN.....	73
Tabla 5. KD obtenidas de los híbridos PNA/ADN.....	76
Tabla 6. Peso de los hígados de hámsters.....	80

Resumen

Entamoeba histolytica es un protozoo parásito intestinal extracelular de distribución cosmopolita y el cual es el agente etiológico de la amibiasis. Este es un organismo unicelular simple, ya que, aunque presenta un núcleo, carece de mitocondrias, peroxisomas y de organelos estructurados reconocibles tales como el complejo de Golgi y Retículo Endoplásmico. Aunque en el presente se lleva a cabo la secuenciación del genoma de *E. histolytica*, el estudio de la función génica en este parásito ha sido muy limitado. Esto se debe a que no es posible aplicar muchas de las técnicas de genética estándar, ya que no posee un ciclo sexual conocido, su genoma es de ploidía compleja y cuenta con un número variable de núcleos en poblaciones celulares. A la fecha no se sabe si existe recombinación homóloga en amibas o sistemas virales amibianos, por lo que la única herramienta genética molecular, que se puede utilizar hoy, consiste en la supresión de la expresión génica. Básicamente, se cuenta con tres métodos de supresión génica en este parásito: ácidos péptido nucleicos (PNA), ARN antisentido y recientemente ARN interferente.

Los PNAs son análogos sintéticos de oligonucleótidos de ADN y ARN. Presentan un esqueleto pseudopeptídico formado por monómeros de N-(2-aminoetil)glicina, los cuales son aquirales, sin carga y levemente hidrofóbicos. Se ha demostrado que los PNAs son capaces de inhibir tanto la transcripción como la traducción en diferentes tipos celulares. En trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, se ha observado que éstos son naturalmente permeables y capaces de inhibir específicamente la traducción del gene blanco.

En el presente estudio se evaluó a los PNAs como agentes supresores de la expresión génica en *Entamoeba histolytica*, así como sus probables mecanismos de interacción con su ARNm blanco, por medio de la generación de variantes de éstos con respecto a modificaciones covalentes. Para dicho efecto se realizaron estudios a diferentes niveles: cinética de hibridación en fase sólida, hibridación en fase líquida, traducción *in vitro*, inhibición de la traducción en células en cultivo y por último, *in vivo*, inhibición de formación de abscesos hepáticos en hámsters.

Hasta este momento se han realizado todo tipo de estudios con los PNAs, desde la caracterización fisicoquímica hasta modelos *in vivo*, pero siempre de una manera aislada. De aquí la relevancia de este trabajo, en el cual se presenta un estudio multinivel, el cual nos permitió evaluar y determinar las consideraciones de uso de los PNAs como agentes supresores de la expresión génica en el parásito *Entamoeba histolytica*.

Abstract

The intestinal extracellular protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, of cosmopolitan distribution, is the etiological agent of the human amebiasis. It is a simple unicellular organism, characterized by the lack of mitochondria, peroxisomes and well defined organelles such as the Golgi complex and Endoplasmic Reticulum. Analysis of gene function in this parasite has been very limited, even though its genome is being sequenced. The absence of a sexual cycle, the complex ploidy of its genome and the variable number of nuclei in cellular populations, are some of the impediments for the use of conventional genetic techniques. Even today no homologous recombination mechanisms or amebic viral systems are known, making genetic suppression the only molecular genetic approach. Peptide nucleic acids (PNA) or antisense RNA are, basically, the two available genetic tools at the moment.

PNAs are synthetic analogues of DNA or RNA oligonucleotides. They have a pseudopeptide backbone composed of N-(2-aminoethyl)glycine monomers, which are achiral, without net charge and considerably hydrophobic. Specific inhibition of transcription and translation with PNA oligomers has been reported in different cellular types. Permeability and specific translation inhibition activity has been observed in PNA treated *E. histolytica* trophozoites.

In the present study, we evaluated the use of PNAs as antisense suppressor agents of *E. histolytica* genetic expression, and possible mechanisms of PNA interaction with its target molecules as a function of covalent modifications. This was done at different levels: kinetics of solid phase hybridization, liquid phase hybridization, *in vitro* translation, translation inhibition in cultured cells and *in vivo* assays.

At this point, a wide range of experiments with PNA have been done, but always in an isolated manner. The relevance of this study rests on the multilevel approach implemented, as the results obtained permitted us to determine some important considerations for the use of PNA as antisense suppressors of gene expression in the parasite *Entamoeba histolytica*.

INTRODUCCION

Entamoeba histolytica.

Biología. *Entamoeba histolytica* (Figura 1)(Phylum: Sarcomastigophora; Subphylum: Sarcodina; Superclase: Rhizopoda; Clase: Lobosea; Orden: Amoebida; Suborden: Tubulina; Familia: Entamoebidae; Género: Entamoeba) está incluida dentro de las siete especies de amiba que pueden colonizar el tracto intestinal humano y es la única con importancia médica. Durante mucho tiempo se pensó que *E. histolytica* podía infectar a su hospedero tanto de forma comensal, sin síntomas, como de forma invasiva, generando lesiones intestinales y extraintestinales, tales como abscesos hepáticos. Ahora se sabe que los diferentes cuadros los producen amibas de distintas especies aunque morfológicamente idénticas. *E. histolytica* es el patógeno responsable de causar amibiasis invasiva y *E. dispar* es un comensal del intestino (Martínez Palomo, 2000; Jackson, 1998; Espinosa-Castellano et al., 1998).

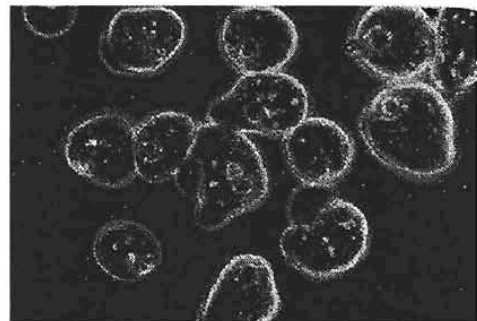


Figura 1. Trofozoítos de *E. histolytica* vistos por contraste de fases.

Ciclo de vida. El ciclo de vida de *E. histolytica* se describió en estudios realizados en monos y se ha extrapolado al humano (Dobell, 1928). El ciclo da comienzo al ingerir quistes presentes en insumos contaminados y comprende de cuatro estadios consecutivos: quistes, formas metaquísticas, trofozoítos y prequistes. Los trofozoítos, o forma invasiva, son los que producen el cuadro patológico al colonizar la mucosa del colon. El estadio de trofozoíto presenta tamaños de 10 a 60 μm de diámetro, se multiplica por fisión binaria y se enquista produciendo quistes tetranucleados típicos después de dos divisiones nucleares sucesivas de quistes uninucleados. De cada quiste emerge una sola amiba metaquística tetranucleada, que produce a su vez ocho trofozoítos uninucleados después de su división.

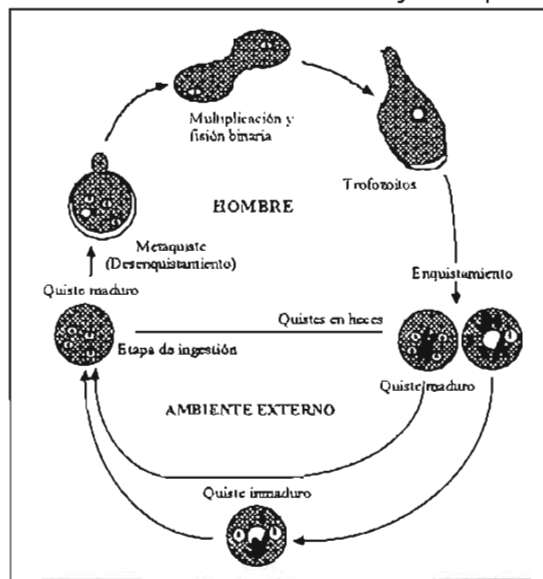


Figura 2. Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Los quistes aparecen en el colon cuando las condiciones de viabilidad para el trofozoíto son desfavorables. Para pasar al estadio de quiste, la amiba elimina los nutrientes y adquiere una forma esférica para constituir un prequiste mononucleado. Enseguida, el quiste se recubre con una resistente membrana externa y el núcleo se divide. Los quistes inmaduros contienen dos núcleos; los maduros, que miden entre 10 y 18 μm de diámetro, tienen cuatro núcleos (Figura 2) (Martínez Palomo 1989; Martínez Palomo 2000; Jackson, 1998). Las amibas que logran difundir al torrente sanguíneo e invadir el hígado son, evolutivamente hablando, estériles ya que nunca dejan al hospedero.

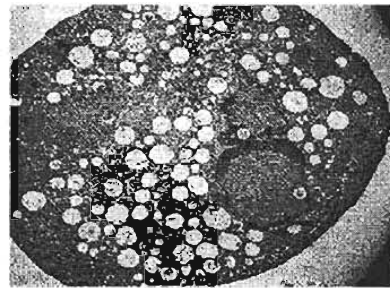
Bioquímica. Bioquímicamente, *E. histolytica* presenta un metabolismo que dista mucho al de los eucariotes más complejos y se acerca más bien al de los procariotes en algunos aspectos. Por ejemplo, carece de hemoproteínas, glutatión, ciclo de Krebs, vía colateral de las pentosas y su glicólisis no está regulada alostéricamente. Es un anaerobio/microaerófilo que carece de mitocondrias y cuyas enzimas glicolíticas son similares a las de bacterias. No cuenta con citocromos, sin embargo, los electrones se transfieren de sustratos reducidos al oxígeno a través de acarreadores como flavinas y centros de Fe (no hemo). No presenta catalasas, peroxidasas u otras enzimas con grupos hemo, no obstante, el trofozoíto puede vivir en una atmósfera de hasta 5% de oxígeno. La principal fuente de energía son los carbohidratos, los cuales se catabolizan por la vía de Embden Meyerhof. El pirofosfato ha reemplazado al ATP como fuente de energía en varias reacciones glicolíticas (Martínez Palomo, 1989; Martínez Palomo, 2000; Carrero, 1996).

Genoma. A nivel molecular, *E. histolytica* presenta también diferencias con los eucariotes avanzados. El tamaño del genoma se calcula entre 2.2 a 3.7×10^8 Kb (Bhattacharya, 2000) y, aunque la ploidía es incierta, parece estar organizado en 31-35 cromosomas de entre 0.3 y 3.3 Mb (Willhoeft y Tannich, 1999). La cromatina se organiza en partículas similares a nucleosomas que se condensan por proteínas de unión a ADN que difieren de las histonas típicas (Torres-Guerrero, 1991). El contenido de G-C es de 22 % y se sabe que en las secuencias codificantes es de 33 %, donde también se muestra una preferencia de A-T del 82 % en la tercera posición del codón (Tannich y Horstmann, 1992). Las regiones intergénicas y las regiones 5' y 3' no traducidas de los ARNm son cortas (Petter *et al.*, 1992; Bruchhaus *et al.*, 1993). La mayoría de los genes carecen de intrones y cuando los hay, son de menos de 100 pb (Bhattacharya, 2000). Aunque la mayoría del ADN está contenido en el núcleo, se ha encontrado ADN en vesículas nucleares tanto libres en el citoplasma como dentro de una estructura tipo cinetoplasto (EhkO) (Solís, 2002). También existen varias copias de plásmidos (episomas), que parecen contener su propio origen de replicación. Estas estructuras de 25 kb de longitud (existen alrededor de 200 por célula) contienen los genes ribosomales (Bhattacharya, 1989; Hubber, 1989).

***Entamoeba histolytica* como un eucariote minimizado.** *E. histolytica* ha sido propuesto como un eucariote atípico, situado en un punto muy primitivo de la evolución eucariótica ya que aunque presenta un núcleo, carece de mitocondrias, peroxisomas y de organelos bien definidos tales como el complejo de Golgi y Retículo Endoplásmico (Martínez-Palomo, 1982 y 1986)(Figura 3). Sin embargo, estudios de filogenia basados en la secuencia de ARNr (Clark, 1995), sitúan a *Eh* como un eucariote menos primitivo. Esta última postura ha sido apoyada por la identificación de genes de *Eh* relacionados con proteínas mitocondriales (Clark, 1995) y de genes que contienen intrones (Sánchez-López, 1998). También, se ha observado que la expresión génica se asemeja a la transcripción monocistrónica de eucariotes recientes, así como elementos reguladores como las cajas TATA y un spliceosoma funcional (Miranda, 1996).

Este mosaico supone que, independientemente de un origen antiguo o reciente, *Eh* presenta una serie de características asombrosas, por lo cual se le propone como un eucariote minimizado, el cual quizás ha ido perdiendo ciertas características de células eucariotes superiores probablemente como consecuencia de su adaptación al tipo de vida parasitario.

Figura 3. Microscopía electrónica de un trofozoíto de *E. histolytica*, la cual muestra la ausencia de organelos tales como el Aparato de Golgi y el Retículo Endoplásmico.



Amibiasis y factores de virulencia. *E. histolytica* es un protozoario parásito intestinal extracelular que presenta una distribución cosmopolita. *E. histolytica* causa, aproximadamente, 50 millones de casos de absceso hepático y colitis invasiva anualmente en países subdesarrollados, y es considerada la tercera causa de muerte en humanos provocada por parásitos después de la malaria y la esquistosomiasis (Walsh, 1986). En México, se estima que anualmente se presentan 1 millón de casos de amibiasis y aproximadamente de 1,000 muertes ocasionadas por *E. histolytica*.

La invasión parasitaria, por *E. histolytica*, es un proceso activo, mediado por trofozoítos, del cual se pueden distinguir 4 etapas: a) adhesión a la mucosa intestinal; b) muerte celular mediada por contacto y actividad enzimática; c) disrupción de la pared intestinal; y d) transporte a través del sistema vascular (Das, 1999; Espinoza-Castellano, 2000). A continuación se detallan algunos de los factores de virulencia identificados en *E. histolytica* importantes para su patogenicidad y virulencia.

Factores de adherencia. La adhesión del parásito a su célula blanco depende primordialmente de la unión de su lectina Gal/Nac a residuos de galactosa o N-acetil-galactosamina, presentes en glicoproteínas de la célula blanco (Chadee, 1987). Esta lectina es una glicoproteína de superficie que

consiste en una cadena pesada de 170 KDa unida mediante puentes disulfuro con una cadena ligera de 35 KDa (Petri, 1989). Otras moléculas que pueden estar involucradas en la adherencia son la adhesina EhADH112 (García-Rivera, 1999), la lectina de 220 KDa (Rosales-Encina, 1989) y el fosfolipoglicano de superficie (Stanley, 1992).

Péptidos formadores de poro. El amibaporo, el cual se ha acreditado como el principal responsable del efecto citolítico, es un péptido de alrededor 7 KDa y el cual presenta tres isoformas. El mecanismo citolítico propuesto para el amibaporo se basa en su secreción e inserción (independiente de receptores) en membranas celulares formando canales iónicos al oligomerizar (Leippe, 1991 y 1995).

Actividad enzimática. Varias actividades enzimáticas han sido identificadas en este parásito, las cuales en mayor o menor medida, podrían estar contribuyendo al efecto lítico sobre la célula blanco. Algunas de estas enzimas son, la colagenasa (Muñoz, 1984), fosfolipasa A (Ravdin, 1985) y proteasas de cisteínas (CP)(Perez-Monfort, 1987). De estas últimas, la proteasa de cisteína 5 (CP5) es la más abundante, constituye el 40 % de las CP de amiba, y se encuentra asociada a membrana. Cabe destacar que CP5 está ausente en la amiba no patogénica *E. dispar* (Bruchhaus, 1996).

A pesar de lo antes mencionado, también se ha propuesto que la respuesta inflamatoria del hospedero puede llegar a tener un papel determinante, ya que en estudios *in vivo* (hamster leucopénicos) se ha observado que la presencia de los trofozoítos en el hígado no es suficiente para la formación de abscesos (Olivos-García, 2004).

Vía secretoria de E. histolytica. La presencia de una vía secretoria típica en *E. histolytica* ha sido propuesta en gran medida debido a que se han identificado genes homólogos a componentes moleculares de la vía secretoria en otros eucariotes. Tales genes son: SRP54, componente del complejo SRP que participa en el mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal y encargado de la conducción de las proteínas nacientes hacia y a través de la membrana del RE (Ramos, 1997); Sec61, componente del canal de translocación de proteínas a través de la membrana del RE (Sánchez-López, 2000); STT3, componente del complejo oligosacariltransferasa que participa en N-glicosilación (Gutiérrez, 2000); BIP, proteína residente del RE que funciona como chaperona durante el plegamiento de polipéptidos nacientes (Gosh, 1999); PDI, isomerasa de puentes disulfuro de proteínas asociada al plegamiento correcto (Ramos *et al.*, 2000); ERD2, receptor de *cis*-Golgi que participa en el transporte retrógrado de proteínas residentes del RE que presentan la etiqueta KDEL (Sánchez-López, 1998); Rab7, Rab11, RabA (Temesvari, 1999), RabB (Rodríguez, 2000), Rab5 (Saito-Nakano, 2000) y Rab8 (Juárez, 2000), las cuales son GTPasas de bajo peso molecular involucradas en el tráfico vesicular.

Por otro lado, existen evidencias de que las funciones de la vía secretoria son realizadas en el trofozoíto. *E. histolytica* es capaz de secretar activamente proteínas (por ejemplo factores de virulencia) y proteínas de

membrana plasmática son selectivamente dirigidas hacia su destino (por ejemplo la lectina Gal/Nac). Además, proteínas, como el caso de la lectina, presentan el corte proteolítico de su péptido señal, como sucedería en la traslocación al RE en eucariotas típicos. Por último, existe evidencia de que *E. histolytica* es capaz de realizar O- y N-glicosilación (Sánchez-López, 2000; Vargas-Rodríguez, 1998).

Degradación de proteínas por el proteasoma en *Entamoeba histolytica*. Con respecto a la degradación de proteínas por el proteasoma en *E. histolytica*, pocos han sido los estudios realizados. En *E. histolytica* se ha descrito tanto la presencia y actividad de la partícula 20S (Scholze, 1996), como secuencias homólogas a las subunidades de la partícula 20S y 19S (Ramos, 1997; Hellberg, 1999). También, se ha demostrado en *E. invadens* que un funcionamiento normal por parte del proteasoma es requerido para la diferenciación de trofozoíto a quiste (Gonzalez, 1999). Por último, recientemente se reportó, por nosotros y como parte de este trabajo doctoral, la distribución subcelular del proteasoma en este parásito (Sánchez, 2002).

Inhibición de la expresión génica en *Entamoeba histolytica*. Aunque en el presente se avanza en la secuenciación del genoma de *E. histolytica*, ha sido muy limitado el estudio de la función génica en este parásito. Esto se debe a que no es posible aplicar muchas de las técnicas de genética estándar, ya *E. histolytica* que no posee un ciclo sexual conocido, su genoma es de ploidía compleja y cuenta con un número variable de núcleos en poblaciones celulares. A la fecha, no se conocen sistemas de recombinación homóloga para amibas o virus amibianos, por lo que la única herramienta genética molecular hoy, consiste en la supresión de la expresión génica y la sobreexpresión a partir de plásmidos.

Básicamente se cuenta con dos métodos de supresión génica en este parásito, ácidos péptido nucleicos (PNA) y ARN antisentido (transfección de trofozoítos con plásmidos codificantes para ARN antisentido; el gene que se desea inhibir se clona en dirección opuesta en el plásmido) (Stock, 2001; Ankri, 1998 y 1999; Bracha, 2000).

Ankri y colaboradores reportaron por primera vez, en 1998, la inhibición específica de una proteína amibiana en células de cultivo mediante la utilización de ARN antisentido. Con esta metodología, lograron disminuir específicamente la expresión de tres genes amibianos, con una eficiencia de inhibición de un 70 % con respecto al control (Ankri, 1998). Debido a que esta metodología requiere de una excesiva manipulación de los trofozoítos, se han puesto en tela de juicio los fenotipos obtenidos con este procedimiento, ya que éstos pueden deberse al estrés en el cual se encuentran los trofozoítos y no a la bajada específica de la proteína blanco (Petri, 1999).

Nuestro grupo ha utilizado un enfoque diferente, manipular y modificar lo menos posible a los trofozoítos, siendo el único blanco de alteración las moléculas de ácidos péptido nucleicos. Esto aumenta la confianza en que los fenotipos que observamos son ocasionados por la disminución específica de las proteínas blanco. En estos estudios lo único que se hace es adicionar las

moléculas de PNA al medio de cultivo con los trofozoítos e incubarlas el tiempo deseado. Las inhibiciones alcanzadas con esta metodología son comparables a las obtenidas utilizando ARN antisentido (70 % de inhibición con respecto al control) (Stock, 2001) (anexo 1).

Recientemente, el grupo de Mirelman al tratar de sobreexpresar el péptido de amibaporo, *Ehap-a*, (transfectando amibas con plásmidos que contenían tanto la región codificante como las regiones 5' y 3' del gene en dirección sentido) observó que la producción de amibaporo tanto endógena como la de plásmido era totalmente abolida. Posteriormente, determinaron que la región 5' no traducida era suficiente para inhibir totalmente la expresión endógena de amibaporo. En este artículo concluyen que el silenciamiento observado es a nivel transcripcional, ya que la inhibición se logró utilizando solamente la región homóloga 5', el inicio de la transcripción de *Ehap-a* estaba bloqueado y, por último, no se detectó la presencia de fragmentos pequeños de ARN de doble cadena codificantes ni no codificantes de *Ehap-a* (Bracha, 2003).

Transporte y secreción.

Generalidades. El mantenimiento de la organización estructural y funcional, tanto en células procariotas como eucariotas, requiere de situar a las proteínas sintetizadas en el sitio indicado para su correcta funcionalidad. Para dicho efecto, la célula ha tenido que especializar procesos de localización subcelular adecuados para cada una de sus moléculas. En procariotas, de manera general, las proteínas son sintetizadas en el citoplasma y pueden permanecer en él o, mediante señales peptídicas adecuadas, pueden ser dirigidas a organelos, ser insertadas o secretadas a través de la membrana plasmática (Rothblatt, 1994).

Para el caso de las células eucariotas, la localización subcelular se logra mediante un transporte intracelular a través de un sistema endomembranoso. En este sistema, las membranas con permeabilidad selectiva organizan y separan las reacciones bioquímicas de un organelo, generando compartimientos morfológicamente distintos y funcionalmente especializados. Además de contener transportadores responsables de la importación y exportación de metabolitos, las membranas poseen los mecanismos para importar e incorporar las proteínas que hacen único a cada compartimiento (Mellman, 2000). Para explicar este flujo intracelular de moléculas han surgido varios modelos, empero, sólo dos han logrado trascender: el modelo vesicular y el modelo de maduración de cisternas.

La transferencia de moléculas entre compartimientos, explicado por el modelo de transporte vesicular, propone que ésta se lleva a cabo mediante pequeñas vesículas membranosas. (Palade, 1975) (Figura 4). Esta transferencia es siempre de una manera direccional, desde el compartimiento donador hacia el aceptor. Típicamente, estos compartimientos están compuestos de membranas bioquímicamente distintas y por una serie de etiquetas moleculares, que permiten la interacción y fusión sólo con el compartimiento apropiado. Estas etiquetas incluyen a las proteínas SNARE y Rab (GTPasas de bajo peso molecular)(Soogard, 1994).

De acuerdo con el modelo de maduración de cisternas, el material es transportado sin abandonar el lumen de la cisterna y es ésta la que madura secuencialmente hasta alcanzar su destino final (Mironov, 1997).

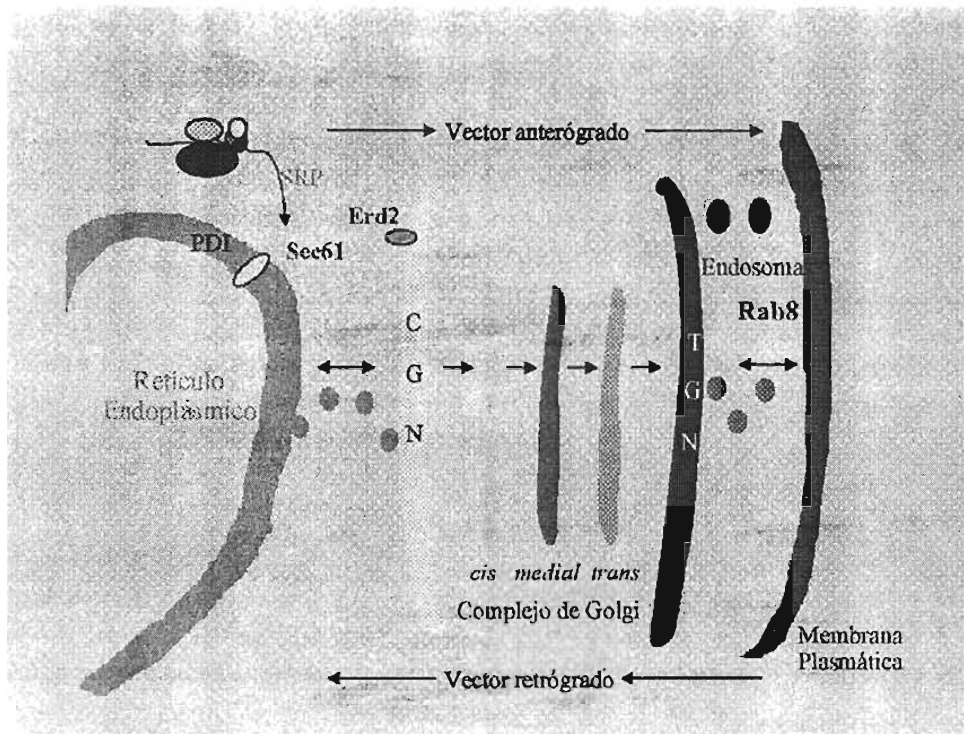


Figura 4. Esquemización de una vía secretoria eucariota típica.

La vía secretoria en eucariotas. La secreción de proteínas en una célula eucariota puede dividirse en cuatro etapas principales: a) transporte y translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE); b) proteólisis, glicosilación y plegamiento en el lumen del RE; c) transporte hacia el aparato de Golgi (AP) y maduración de las proteínas; y d) transporte vesicular hacia el compartimento blanco o ambiente extracelular (Sakaguchi, 1997).

Transporte y translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico. Al ensamblarse el ribosoma sobre el ARNm en el citoplasma y comenzar la traducción, la proteína nascente puede seguir dos diferentes caminos; continúa sintetizándose en el citoplasma, o es reconocida y transportada a la membrana del RE por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP). Esta partícula 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. Una vez en la membrana del RE, el complejo ribosoma-polipéptido-ARN-SRP interacciona con el receptor para la SRP, lo que ocasiona la disociación de la molécula SRP del complejo y posiciona al péptido nascente sobre el canal de translocación. Posteriormente se reinicia la traducción y da comienzo la translocación. El canal de translocación es un complejo de proteínas transmembranales que genera un entorno hidrofílico en la membrana para que el péptido sea capaz de atravesar hacia el lumen del compartimento. El complejo de translocación está compuesto por varias proteínas, de las cuales destacan el receptor de SRP, las proteínas TRAM y el complejo Sec61 (Sec61 α , β y γ). Las proteínas de

membrana son insertadas en ésta por la misma maquinaria de translocación por un mecanismo poco conocido (Johnson, 1999).

Glicosilación y plegamiento en el lumen del retículo endoplásmico. La glicosilación y plegamiento de proteínas se inicia mientras éstas son translocadas al lumen del RE. Durante la translocación del polipéptido nascente, algunas proteínas chaperonas, como Bip, se unen a éste, favoreciendo el plegamiento correcto. Además, en este momento se inicia la formación de puentes disulfuro, catalizada por la enzima PDI, y la transferencia de oligosacáridos, catalizada por el complejo oligosacaril transferasa. Si la proteína no posee señales de residencia para el RE y ha sido plegada correctamente, continúa su camino hacia el aparato de Golgi en vesículas cubiertas por el complejo COPII (Mellman, 2000).

Transporte hacia el aparato de Golgi y maduración de las proteínas. Al fusionarse las vesículas tipo COPII con la membrana del *cis*-Golgi y liberar su contenido en el lumen de éste, las modificaciones a las proteínas para su maduración continúan. La maduración de las proteínas se da durante su paso a través de las distintas cisternas del complejo de Golgi (*cis-medial-trans*) y pueden sufrir modificaciones como O-glicosilación y rearrreglo de azúcares, sulfatación, fosforilación y proteólisis. 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).

Transporte vesicular hacia el compartimiento blanco o ambiente extracelular. Una vez que las proteínas alcanzan su maduración final en el *trans*-Golgi, están listas para ser secretadas o localizadas a su destino final. En esta cisterna 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 anclado y fusión de la vesícula en la membrana blanco, de las cuales la más caracterizada es la familia de proteínas Rab.

Degradación de proteínas por el proteasoma.

El tiempo de vida de una proteína en una célula está determinado por la función que realiza y por la etapa del ciclo celular en que se encuentra la célula. Una vez cumplida su función o el cambio de etapa de la célula, ésta se vuelve más propensa a la degradación por enzimas específicas o mecanismos generales. El mecanismo de degradación general de proteínas citosólicas es esencialmente llevado a cabo por el proteasoma. Este se conoce en el presente como el sistema de ubiquitinación/proteasoma, ya que la gran mayoría de las proteínas que son degradadas por este sistema primero sufren una conjugación (marcaje) covalente de una cadena multimérica de ubiquitinas. Una vez "marcadas" estas proteínas son degradadas rápidamente por el proteasoma en una forma ATP dependiente (Hochstrasser, 1995).

El proteasoma 26S es un complejo cilíndrico de 2100 KDa, compuesto de dos partículas, la proteolítica (20S) y el *cap* regulador (19S). En los sistemas estudiados, la partícula 20S (700 KDa) está formada por 28 subunidades, formadas por los productos de 7 genes homólogos α y β . Estas subunidades generan un arreglo de 4 aros con 7 subunidades cada uno de ellos. Los dos aros externos se componen exclusivamente de subunidades α , mientras que los dos aros interiores se componen de subunidades β , las cuales presentan la actividad proteolítica (Figura 5). La partícula 19S (700 KDa) es un complejo formado por 20 subunidades, la cual puede unirse a la partícula 20S por uno o ambos extremos. Esta partícula es la que le confiere al proteasoma la actividad de degradación de proteínas dependiente de ATP y ubiquitinación (Figura 6). De la misma manera, la subunidad 11S al unirse a la partícula 20S promueve la degradación ATP-independiente de péptidos que no han sido ubiquitinados (en el caso de células de mamífero) (DeMartino, 1999).

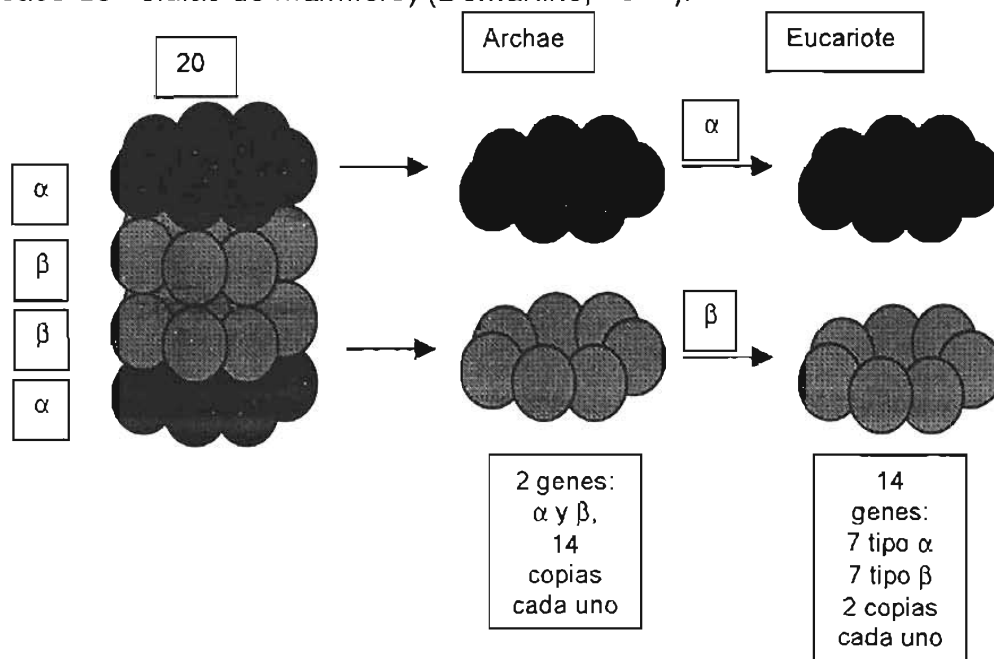


Figura 5. Organización estructural del proteasoma.

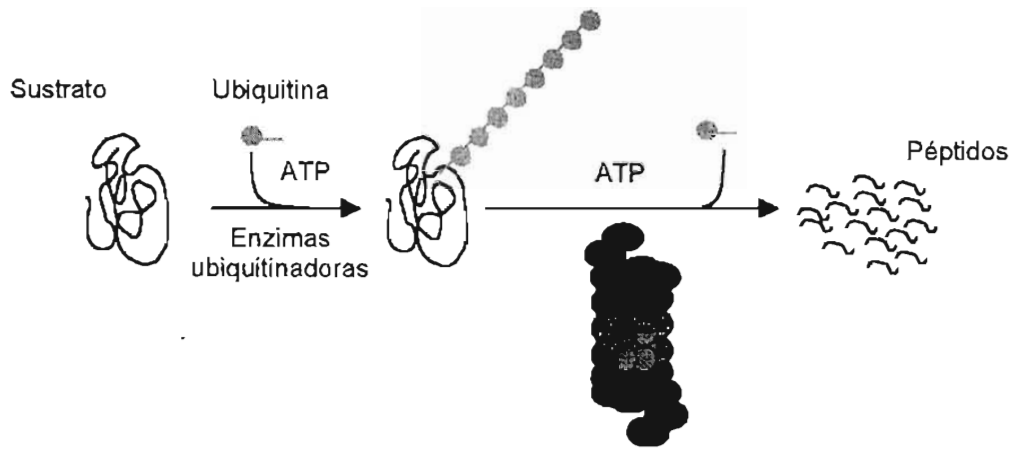


Figura 6. Sistema de degradación de proteínas Ubiquitina/Proteasoma.

Supresión génica.

Generalidades. En 1953 se describió la estructura de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN), suceso que permitió a la comunidad científica investigar las bases moleculares de la herencia. Enseguida, se generaron cantidades abrumadoras de información, lo cual catalizó el establecimiento del área que hoy conocemos como biología molecular. La dirección que siguió gran parte de la biología molecular, y como la seguimos entendiendo hasta estos tiempos, fue determinar la relación que existía entre ADN, ARN y proteína, y la importancia de éstos a nivel celular.

La expresión génica se puede inhibir en dos niveles, a nivel de la transcripción y a nivel de la traducción. Por consenso general se ha denominado inhibición antigene cuando se bloquea la transcripción, e inhibición antisentido cuando se bloquea la traducción. Como se puede inferir de manera lógica, la inhibición antigene disminuye tanto los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como los de la proteína codificada por éste, mientras que en la inhibición antisentido, en principio, sólo se disminuyen los niveles de proteína (Figura 7).

En 1978, Paul Zamecnik reportó por vez primera la utilización de oligonucleótidos como agentes antisentido, los cuales cuando eran adicionados exógenamente a cultivos celulares con virus de sarcoma Rous, inhibían la replicación de éste en células infectadas. En este reporte, se enfatizó la posible aplicación de oligómeros como agentes quimioterapéuticos generales y se propusieron las bases para el diseño exitoso de oligómeros antisentido, las cuales radican en dos características fundamentales: especificidad y afinidad. A partir de esto, los ácidos nucleicos antisentido atrajeron un gran interés como una nueva clase de posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones virales, cáncer y desórdenes genéticos, debido a su capacidad de inhibir específicamente la expresión de genes asociados a ciertos padecimientos. Sin embargo, una gran desventaja que atrasó la utilización de los oligómeros naturales fue el hecho de que son degradados rápidamente por nucleasas, siendo necesaria la administración repetida de éstos para lograr mantener una dosis terapéutica. Debido a esto, a mediados de los años 80, se inició la carrera por diseñar análogos de ácidos nucleicos biológicamente estables (resistentes a nucleasas) que mantuvieran las características de hibridación a ARN y ADN natural.

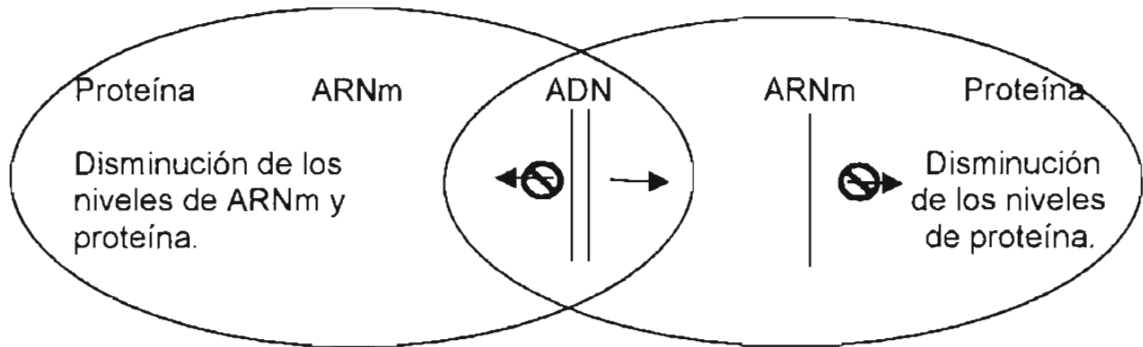


Figura 7. Inhibición de la expresión génica. Izquierda: inhibición antigene, disminuyen tanto los niveles de ARNm como de proteína. Derecha: inhibición antisentido, sólo disminuyen los niveles de proteína.

Análogos. Los análogos sintéticos que se han generado hasta este momento se pueden dividir en tres grandes grupos: 1) los modificados en el grupo fosfato; 2) los modificados en el azúcar (ribosa) y 3) los modificados en ambos grupos (Figura 8). Los modificados en el grupo fosfato incluyen a los fosfarimidatos, fosforoditioatos, fosforotriésteres, boranofosfatos y fosforotiatos; estos últimos, que son los más estudiados hasta la fecha, conservan las propiedades de hibridación con ADN, pero la formación de híbridos y el apareamiento de bases están alterados, además de que se unen inespecíficamente a proteínas de unión a ADN. Para el siguiente grupo, se propuso 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, pero sólo unos pocos lograron imitar satisfactoriamente la geometría del enlace fosfodiéster. Por último, en la clasificación de los modificados en ambos grupos, destacan los llamados ácidos péptido nucleicos (PNA), en los cuales se sustituyó el esqueleto desoxirribofosfato por un esqueleto pseudopeptídico (Nielsen, 1995).

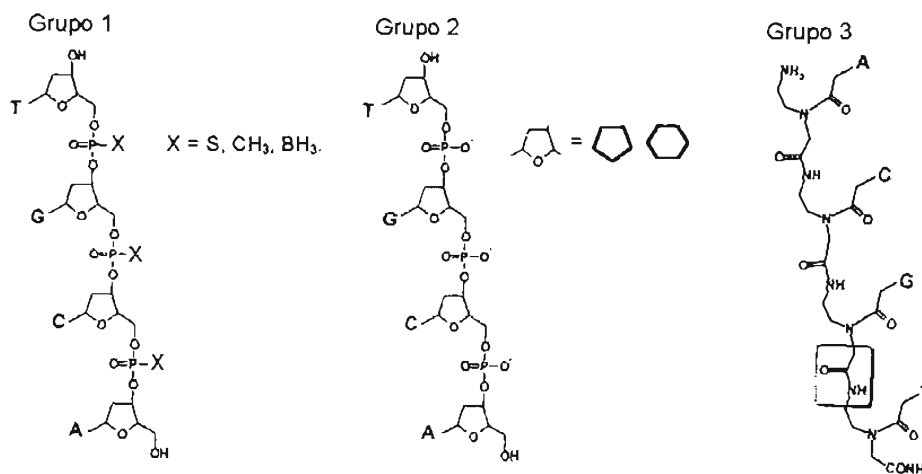


Figura 8. Esquematzación de los tres grupos de análogos sintetizados.

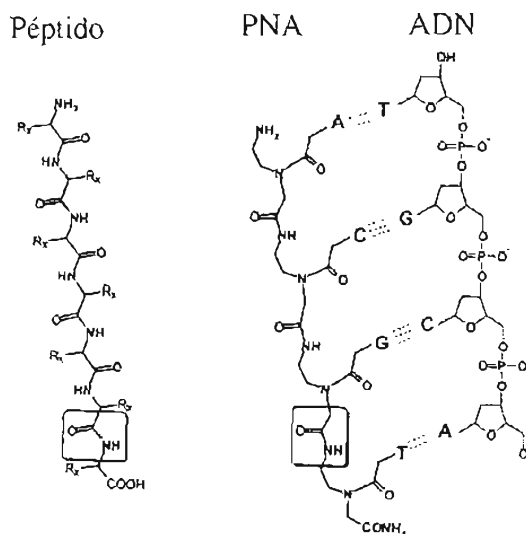
Acidos Péptido Nucleicos (PNA) e inhibición génica.

Generalidades. Estos análogos fueron inicialmente descritos y sintetizados en 1992 por Nielsen y colaboradores (Hyrup, 1996). En el presente, la síntesis química de PNA se lleva a cabo por medio de métodos análogos utilizados en la síntesis de péptidos, encontrándose en el mercado monómeros para la química tbc y fmoc.

Los PNA son análogos sintéticos de oligonucleótidos de ADN y ARN. Presentan un esqueleto pseudopeptídico formado por monómeros de N-(2-aminoetil)glicina, los cuales son aquirales, sin carga y levemente hidrofóbicos. Las bases purínicas (A, G) y pirimidínicas (C, T) se encuentran ancladas al esqueleto pseudopeptídico por medio de enlaces metil-carbonilo. A diferencia de los oligonucleótidos naturales, ADN y ARN, las moléculas de PNA no contienen azúcar (pentosa) ni grupos fosfatos (Figura 9).

Por nomenclatura convencional, el amino terminal de los PNAs representa el 5', mientras que el carboxilo terminal representa el 3' del oligonucleótido natural. Los PNA pueden hibridar con su ácido nucleico complementario con una orientación tanto paralela como antiparalela. Sin embargo, la orientación antiparalela se prefiere predominantemente (Good, 1998). Los dúplexes que se mencionan en esta tesis son antiparalelos, a menos que se indique lo contrario.

Figura 9. Estructura química de un péptido, PNA y una molécula de ADN. El enlace amídico característico de los péptidos y PNA está en cuadro. [Ilustración tomada del libro *Peptide Nucleic Acids Protocols and Applications*, Nielsen P. and Egholm M. Horizon scientific press. 1999.]



Propiedades. El carácter neutral del esqueleto de los PNAs es una propiedad importante. En términos de estabilidad, se ha demostrado que, a baja y mediana fuerza iónica, los complejos complementarios PNA/ADN son más estables que los complejos correspondientes de ADN/ADN. Esto se atribuye a la ausencia de repulsión de cargas entre la molécula de PNA y ADN. Por otro lado, y de cierta manera inesperadamente, la especificidad de los complejos PNA/ADN es mayor que la observada en los complejos naturales. Un cambio de una base en la secuencia complementaria de los oligonucleótidos, es generalmente más perturbadora en los dúplexes PNA/ADN que en los dúplexes ADN/ADN. Se han generado 15meros de PNA o ADN con todos los cambios únicos posibles (*mismatch*) y se ha evaluado el cambio en la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) para todos ellos. En los dúplexes PNA/ADN el promedio del ΔT_m fue 15°C, mientras que para el caso de los dúplexes correspondientes de ADN/ADN fue de 11°C (Egholm, 1993). Resultados similares se han reportado para complejos PNA/ARN (Jensen, 1997). Así mismo, la neutralidad del esqueleto del PNA, hace que la velocidad de hibridación con su secuencia blanco sea significativamente mayor que la de su análogo natural. Desde una perspectiva clínica, los oligómeros de PNA interaccionan poco o nada con proteínas séricas.

La carencia de repulsión electrostática entre las dos cadenas del dúplex PNA/ácido nucleico, hace que en gran medida la temperatura de desnaturalización (T_m) sea independiente de la concentración de sales. Esto hace que en condiciones fisiológicas de sal (NaCl), se observe una diferencia significativa de la estabilidad (T_m) entre ambos dúplexes (Figura 10). A pesar de no depender de la fuerza iónica, la T_m de los dúplexes PNA/ADN, correlaciona en mayor o menor medida con el contenido G-C y con el contenido de purinas en la hebra de PNA. Basados en en estos datos y en la T_m calculada para dúplexes ADN/ADN, se generó una fórmula empírica para la determinación de la T_m de dúplexes que contienen PNA.

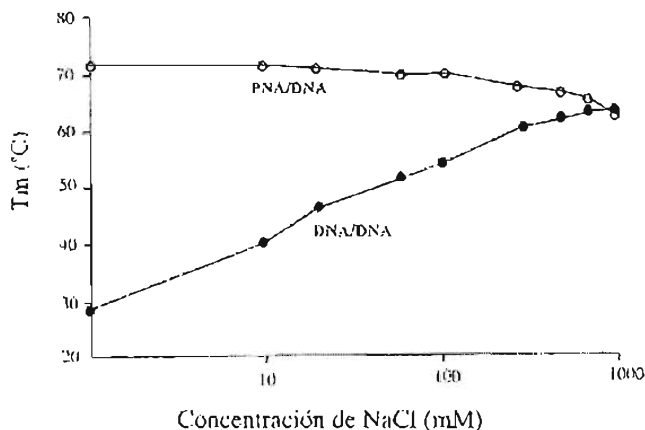
$$T_m = c_0 + c_1 * T_m(\text{nnADN}) + c_2 * f_{\text{pyr}} + c_3 * \text{longitud}$$

En donde $T_m(\text{nnADN})$ es la T_m calculada del dúplex natural determinada con el modelo *nearest neighbour* y utilizando los valores ΔH° (cambio en la entalpía) y ΔS° (cambio en la entropía) descritos por SantaLucia (SantaLucia, 1996). f_{pyr} denota el contenido fraccionario de bases pirimidínicas y "longitud" es la cantidad de monómeros de la secuencia del PNA. El valor de las constantes se determinó en $c_0=20.79$, $c_1=0.83$, $c_2=-26.13$ y $c_3=0.44$ (Giesen, 1998).

La estructura tridimensional de los dúplexes PNA/ADN y PNA/ARN se resolvió por resonancia magnética nuclear (NMR) y cristalografía de rayos-X. Se concluyó que las moléculas de PNA son fácilmente moldeables y se adaptan a la estructura del ácido nucleico blanco, conformación A o B para dúplexes con ARN y ADN respectivamente (Nikiforov, 1999).

Los PNA, debido a su naturaleza quimérica, 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.

Figura 10. Dependencia de la fuerza iónica sobre la estabilidad térmica (T_m) de dúplex de PNA/ADN y ADN/ADN. [Ilustración tomada del libro *Peptide Nucleic Acids Protocols and Applications*, Nielsen P. and Egholm M. Horizon scientific press. 1999.]



Debido a la alta afinidad, especificidad y estabilidad *in vivo* que presentan los PNAs, su posible utilización como agentes antisentido para el tratamiento de enfermedades tales como infecciones virales y cáncer ha despertado un gran interés.

PNAs e inhibición génica. Estudios de traducción *in vitro*, en sistemas libres de células, han demostrado que los PNAs son capaces de inhibir la traducción eucariótica mediante la formación de dúplexes tanto en la región de inicio de traducción como en la región 5' no traducida y, en menor medida, en la región codificante. Se sabe que los híbridos PNA/ARN no activan a la enzima RNasa H, por lo cual la inhibición depende de otros mecanismos, tal vez un impedimento estérico o una desestabilización biológica de los ARNm. Por otro lado, estudios de Biacore y determinaciones de la T_m han demostrado que la velocidad de formación del híbrido correlaciona con la estabilidad de éste (Jensen, 1997).

Al utilizar cepas de *E. coli* permeables o ser introducidos en células por medio de microinyección, se ha observado que concentraciones micromolares de PNA son suficientes para inhibir efectiva y selectivamente la transcripción y la traducción de los ácidos nucleicos complementarios (Good y Nielsen, 1998a y 1998b).

Uno de los grandes impedimentos en la utilización de los PNAs como agentes antisentido ha sido su baja permeabilidad celular (Good, 2001). Para sobrepasar este obstáculo, se propuso generar conjugados de PNAs con moléculas acarreadoras.

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 gene c-myc (Boffa, comunicación personal).

Al utilizar sistemas *in vivo*, se ha demostrado que las células neuronales son excepcionalmente permeables a las moléculas de PNA. En estudios recientes se ha demostrado que PNAs administrados por vía intraperitoneal en ratas, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y tener un efecto antisentido específico sobre el gene de neurotensina (Beth, 1999).

En el laboratorio, se ha observado que células de Eh son naturalmente permeables a oligómeros de PNAs no modificados de longitudes de entre 13 y 20 residuos. Utilizando PNAs a 20 μM se ha logrado una disminución de la

expresión de los genes EhSrp54, EhErd2, EhSec61 y EhRab8, cuando los PNAs estaban dirigidos contra los primeros 17 nucleótidos codificantes del ARNm (Olvera A, tesis de maestría 1999; Saralegui A, tesis de maestría 2002; Stock 2001).

Como se presenta en esta introducción, hasta este momento se han realizado todo tipo de estudios con los PNAs, desde la caracterización fisicoquímica hasta modelos *in vivo*, pero siempre de una manera aislada. De aquí la relevancia de este trabajo, en el cual se presenta un estudio a todos los niveles posibles, el cual nos permitió evaluar y determinar las consideraciones de uso de los PNAs como agentes supresores de la expresión génica en el parásito *Entamoeba histolytica*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la eficiencia de hibridación/bloqueo traduccional de ácidos péptido nucleicos específicos para la expresión del gen Sec61 de *E. histolytica*, con el fin de establecer las condiciones de uso de éstos como agentes supresores de la expresión génica en este parásito.

Objetivos particulares

Llevar a cabo la síntesis química de PNAs que correspondan a las secuencias de bases nitrogenadas blanco para el bloqueo antisentido del gen Sec61 de *E. histolytica*.

Purificar y caracterizar los PNAs sintetizados.

Realizar un estudio sistemático de la permabilidad celular hacia PNAs en términos de: longitud, composición (purina:pirimida) y modificaciones covalentes con grupos acarreadores o señales de localización nuclear descritas.

Clonar, expresar y purificar la proteína recombinante de la subunidad α del proteasoma de *Eh*.

Producir anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante de la subunidad α del proteasoma.

Evaluar el efecto antisentido de los PNAs para Sec61, a nivel de proteína en células en cultivo.

Evaluar el fenotipo de *Eh* ocasionado por el tratamiento con PNAs.

Evaluar el efecto antisentido de los PNAs para Sec61 en la traducción *in vitro*.

Evaluar la cinética de hibridación de los PNAs con oligos de Sec61 mediante estudios de Biacore, así como la estabilidad de los híbridos en solución (T_m).

Evaluar el efecto de los PNAs antisentido para Sec61 sobre la formación de abscesos hepáticos por *Eh* en estudios *in vivo* en hámsters.

MATERIALES Y METODOS

Elección de las secuencias de los PNAs.

Las secuencias de los PNAs antisentido sintetizados se eligieron con base en los siguientes criterios:

- Cubrir el inicio de traducción.
- No hibridar con ningún otro gene o secuencia de *Eh* reportado en el GenBank (esto se determinó utilizando el programa BLAST).
- Tener una longitud de entre 17 y 20 residuos.
- No contener más de seis purinas por cada diez residuos.
- No presentar cuatro residuos G adyacentes.
- Si el PNA era capaz de autohibridar, los híbridos no debían contener más de 4 enlaces A-T y no más de tres enlaces cuando uno de éstos era G-C.

En el caso de los PNAs *scrambled*, la composición de bases nitrogenadas fue la misma que en los antisentido, cambiando solamente la secuencia.

Síntesis de PNA.

Síntesis básica. La síntesis se realizó en fase sólida según un protocolo publicado previamente (Hyrup *et al.*, 1996). Se utilizó resina MBHA (Novabiochem) sin grupo protector y monómeros-tBoc (PerSeptive). Los reactivos utilizados para la síntesis fueron adquiridos de las firmas comerciales Fluka, Sigma, PerSeptive, Burdick and Jackson y Merck.

La resina se preparó para la síntesis lavándola dos veces con DCM, dos veces con NMP y una vez con DMF:Piridina (95:5) en matraces de Merrifield modificados. Posteriormente, la resina se dejó reaccionar, durante 1 h a 40 °C y agitación constante, con la solución del monómero (5 equivalentes de monómero, 4.5 equivalentes de HATU, suficiente NMP para obtener una concentración final de monómero de 0.1 M, 5 equivalentes de DIPEA y 7.5 equivalentes de Sim-Collidina). Una vez terminado el acoplamiento, se descartó el monómero que no hubiese reaccionado con dos lavados de NMP y se acetilaron todos los grupos amino que no reaccionaron con una solución de Anhídrido Acético:Collidina:DMF (5:6:89) durante 5 min a 40 °C y agitación constante. A continuación, la acetilación se inactivó lavando la resina una vez con DMF:Piperidina (95:5) durante 2 min. Como último paso, la resina se lavó tres veces con NMP. Para acoplar el siguiente monómero, la resina se desprotegió con dos lavados de TFA:mCresol (95:5) durante 3 min y agitación. En seguida, la resina se neutralizó mediante tres lavados con NMP y uno con DMF:Piridina (95:5), para posteriormente mezclarla con la solución del siguiente monómero y llevar a cabo los pasos subsecuentes antes mencionados. Para obtener el PNA con la secuencia deseada se llevaron a cabo ciclos de estos pasos, adicionando en cada ciclo el monómero correspondiente a la secuencia de PNA propuesta (Figura 11).

Una vez terminada la síntesis del PNA, éste se separó de la resina. La resina con el PNA se lavó dos veces con DCM y dos veces con TFA, posteriormente, ésta se trató con TFA:TFMSA:mCresol (8:2:1) por dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación, la solución resultante se precipitó en siete volúmenes de éter dietílico frío en agitación. Esta solución se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el sobrenadante se descartó. El precipitado se resuspendió en el mismo volumen de éter frío y se volvió a centrifugar de la misma manera. El sobrenadante se descartó y el éter remanente se evaporó con N₂.

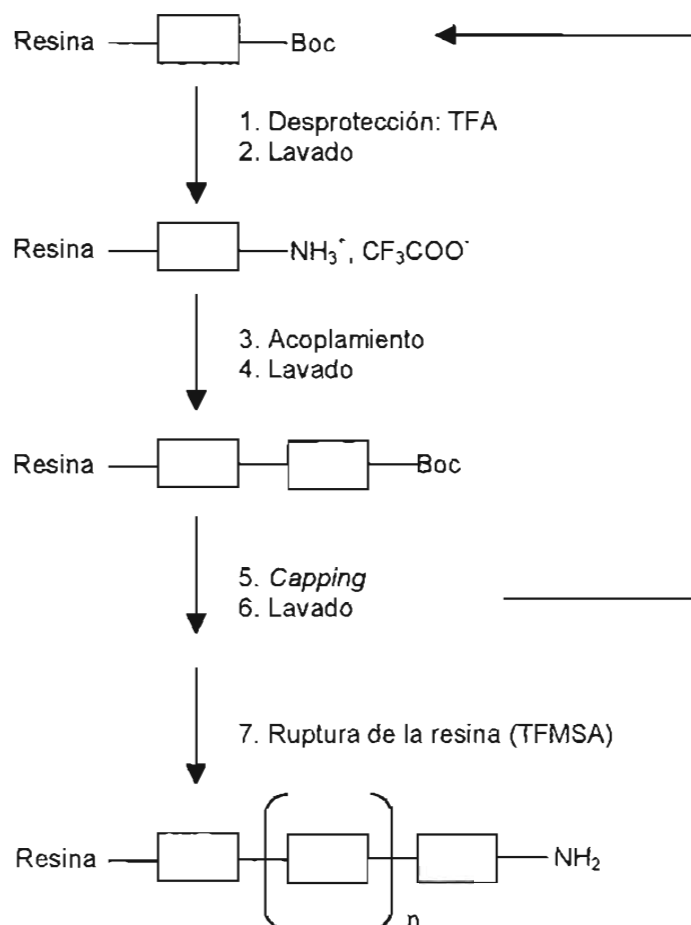


Figura 11. Representación esquemática de la síntesis de PNA en fase sólida. Química tboc.

Derivatizaciones. Acoplamientos directos. Las modificaciones con los ácidos grasos hexanoico, decanoico, mirístico, palmítico, cólico y colesterol hemisuccinato, se realizaron en el extremo amino terminal del PNA (Tabla 1).

Para todos los casos, la resina se dejó reaccionar, durante 1 h a 40 °C y agitación constante, con la solución del ácido graso (5 equivalentes de monómero, 4.5 equivalentes de HATU, suficiente NMP para obtener una concentración final del ácido graso de 0.1 M, 5 equivalentes de DIPEA y 7.5 equivalentes de Sim-Collidina).

Acoplamientos con el espaciador reducible. El espaciador Cys-Cys-1,2-diaminoetano fue amablemente proporcionado por Enrico Millo (Millo, 2002).

El espaciador cistina-1,2-diaminoetano se acopló al amino terminal del PNA (Tabla 1). Una vez que se sintetizó el conjugado PNA-C-C-1,2-diaminoetano, el material se dividió en tres partes iguales. Una parte no se modificó (PNA-C-C-1,2-diaminoetano). Otra parte se modificó con el ácido mirístico, utilizando las mismas condiciones que en el acoplamiento directo (PNA-C-C-1,2-diaminoetano-miristato).

La parte restante se modificó con el péptido penetrina (PNA-C-C-1,2-diaminoetano-Penetrina).

La síntesis de la fracción peptídica del conjugado PNA-C-C-1,2-diaminoetano-penetrina, se realizó utilizando la química fmoc.

La resina se dejó reaccionar durante 1 h a 40 °C y agitación constante, con la solución del aminoácido (5 equivalentes del aminoácido, 4.5 equivalentes de HATU, suficiente NMP para obtener una concentración final del aminoácido de 0.2 M, 5 equivalentes de DIPEA y 7.5 equivalentes de Sim-Collidina). Una vez terminado el acoplamiento, se descartó el aminoácido que no hubiese reaccionado con tres lavados de NMP y se acetilaron todos los grupos amino que no reaccionaron con una solución de Anhídrida Acética:Collidina:DMF (5:6:89) durante 5 min a 40 °C y agitación constante. La resina se lavó tres veces con NMP. Para acoplar el siguiente aminoácido, la resina se desprotegió con un lavado de Piperidina:DMF (2:8) durante 20 min a 40 °C y agitación y se lavó tres veces con NMP. Se utilizaron D-aminoácidos (novabiochem). La secuencia del péptido de penetrina es NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-COOH.

Purificación y caracterización de los PNAs.

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 (EM). La exactitud de la masa determinada es de ± 1 uma (Scarfi *et al.*, 1997). Los PNAs utilizados tuvieron una pureza mínima del 95%.

Secuencias de los PNAs sintetizados.

La secuencia de los PNAs sintetizados se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia y modificaciones de los PNAs sintetizados. Linker: 1,2-diaminoetano.

<u>EhSα</u>	
Antisentido	CONH ₂ -AATACTGATTTTTACTTTTG-Biotina-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -AATGATACTTATTTTTGTCT-Biotina-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -AATACTGATTTTTACTTTTG-Colesterol-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -AATGATACTTATTTTTGTCT-Colesterol-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -AATACTGATTTTTACTT-Colesterol-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -AATGATACTTATTTTTG-Colesterol-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-Acido Cólico-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-Acido Cólico-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-Miristato-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-Miristato-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-Palmitato-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-Palmitato-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -AATACTGATTTTTACTT-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -AATGATACTTATTTTTG-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-AATACTGATTTTTACTT-Cisteína-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-AATGATACTTATTTTTG-Cisteína-NH ₂
<u>EhS2</u>	
Antisentido	CONH ₂ -ATCATTTTGTGGACAGC-Biotina-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -TCAGGACTCAATGGTTT-Biotina-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-ATCATTTTGTGGACAGC-Cisteína-NH ₂
<u>EhSec61α</u>	
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-TACCCTCACAAAAGTT-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-CCATTCACACAGATATA-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -Biotina-K-TACCCTCACAAAAGTT-Miristato-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -Biotina-K-CCATTCACACAGATATA-Miristato-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -TACCCTCACAAAAGTT- Miristato-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -CCATTCACACAGATATA- Miristato-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -TACCCTCACAAAAGTT-K- Miristato-NH ₂
Scrambled	CONH ₂ -CCATTCACACAGATATA-K- Miristato-NH ₂
Antisentido	CONH ₂ -TACCCTCACAAAAGTT-K-Haxanoato-NH ₂

<i>Scrambled</i>	CONH ₂ -CCATTCACACAGATATA-K-Decanoato-NH ₂
<i>Antisentido</i>	CONH ₂ -TACCCTCACAAAAGTT-(Cys) ₂ -Linker-Miristato-NH ₂
<i>Scrambled</i>	CONH ₂ -CCATTCACACAGATATA-(Cys) ₂ -Linker-Miristato-NH ₂
<i>Antisentido</i>	CONH ₂ -TACCCTCACAAAAGTT-(Cys) ₂ -Linker-Penetrina-NH ₂
<i>Scrambled</i>	CONH ₂ -CCATTCACACAGATATA-(Cys) ₂ -Linker-Penetrina-NH ₂

Secuencia de los genes blancos y sitio de hibridación de los PNAs.

En la figura 12 se muestra la región 5', a partir del ATG, de los genes EhSec61, EhS α y EhS2 y el sitio de hibridación de los distintos PNAs antisentido.

```

ATGAGTCGTC CAACTAGTAA AACACCTGTC GAAATTAATG AAGATGATCA
ATTAAAAAAGAA GAGATTGAAC TTCTAGTCAA ACGTATTCAA GACCCAAACA
TTGAAATATC AACTAGTGCT ATTGAGTTAT TCGGTAAAAC ATTAAGGGGA
GATAACACAT CTTCTTCAAC AACACTACCT AAAACAACAA AATT!

ATGGGAGTGT TTTCAATGT CATTAGACCA ATTGTTAGTC TTATTCCAAC
AATCAATGAA CCAAACTAAAA AGATTGGATT TAAAGAAAAA TTGATGTGGA
CAGGAATCAC ATTATTAGTG TTTCTTGTTT GTAGTCAAAT TCCATTAATT
GGAACAGACA TTGTAGGAAA TGATCCATTT TATTGGATGC GTTTAGTTAT!
ATGTTTATGA CTAAAAATGA AAACGATCAT GGTGTTAATA CCTTTTCATC
TGAAGGAAGA TTGTTCCAAG TTGAGTATGC TACAGAAGCA ATGAAATTAG
GATCAACCGT TATTGGTATT CAAACAAAAG AAGGTGTTGT CCTTGCTGTA
GAAAAACGAA TTTTCATCACC ATTAATGCTT!

```

Figura 12. Región 5' de los genes EhS2 (arriba), EhSec61 (medio) y EhS α (abajo). En subrayado se muestra la posición en la que hibridan los PNAs antisentido para cada uno de los genes.

Células.

***Entamoeba histolytica*.** Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HK9 y HM1:IMSS, los cuales se cultivaron axénicamente en medio BI-S-33 a 37 °C (Diamond, 1978).

***E. coli*.** Se utilizaron células de *E. coli* de la cepa XL1 Blue (Stratagene) para transformación por el método del CaCl₂ (Morrison, 1979). Estas se cultivaron en medio LB con 20 µg/ml de carbenicilina y 80 µg/ml de metilicina a 37 °C. Los cultivos se cuantificaron midiendo densidad óptica a 600 nm.

Proteínas recombinantes.

Clonación. Los fragmentos codificantes de los genes EhS α y EhS2 se amplificaron, por separado, utilizando 250 μ M de desoxinucleótidos, 20 pmoles de cada oligonucleótido cebador (**EhS α** : Sentido 5'-CCCGGATCC TTT AGT ACT AAA AAT GAA AA-3' y Antisentido 5'-CCCAAGCTT TTA AAT TAA TTC TTC TTT G-3'; **EhS2**: Sentido 5'-CCCAGATCT AGT CGT CCA ACT AGT AA-3' y Antisentido 5'-GGGGCCGGG CTA GTT ATG CTT AAC TAA-3', según el caso), 1 U de Taq ADN polimerasa (Roche), 70 ng de ADN genómico de amiba y buffer de reacción (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3), en un volumen final de 50 μ L. La amplificación se realizó mediante 30 ciclos (**EhS α** : desnaturalización 1 min a 94 °C, hibridación 1 min a 44 °C y extensión 2 min a 72 °C; **EhS2**: desnaturalización 70 seg a 94 °C, hibridación 80 seg a 40 °C y extensión 1 min a 72 °C) en un termociclador GeneAmp PCR system 9600 Perkin Elmer Cetus. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % sumergidos en buffer TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM, EDTA 1 mM, pH 7) con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, durante tiempos variables a 100 V, voltaje constante. La visualización y registro de los productos se realizaron en un transiluminador UV y fotografía Polaroid. Los fragmentos se escindieron del gel y se purificaron por adsorción a sílica-gel usando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se repararon y fosforilaron con una mezcla de 100 μ M ATP, 250 μ M de desoxinucleótidos, 10 U de polinucleótido quinasa (Roche) y 2 U de Klenow (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 50 μ L a 37 °C por 40 min.

Estos fragmentos fueron clonados en romo en el plásmido de secuenciación pBSSK linearizado con *Sma* I y defosforilado. Se incubaron 40 ng de vector linearizado, 44 ng de EhS α o 40 ng de EhS2, 2 U de T4 ADN ligasa (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 15 μ L toda la noche a 16 °C.

Esta ligación fue utilizada para transformar *E. coli* XL1 Blue competentes. La transformación se realizó según el método del choque térmico (Hanahan, 1983). Se mezclaron 100 μ L de células competentes con 10 μ L de reacción de ligación (20 ng de ADN) y se incubaron en hielo durante 30 min. La mezcla se sometió a un choque térmico de 90 seg a 37 °C y se pasó a hielo por 5 min. Las células se recuperaron en medio SOC durante una hora a 37 °C y se sembraron en LB-agar con el antibiótico adecuado.

Los plásmidos pBSSK-EhS α y pBSSK-EhS2 fueron aislados y purificados por el método de la lisis alcalina, usando el Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD). Estos se caracterizaron mediante un análisis de restricción y 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.

Expresión. Una vez que se confirmó la secuencia de los fragmentos, se prosiguió a subclonarlos en el vector de expresión bacteriana, pQE30. El fragmento EhS α se liberó del plásmido pBSSK utilizando las enzimas *BamHI* y *Hind III*, las cuales también se utilizaron para linearizar el vector pQE30. El fragmento EhS2 se liberó utilizando las enzimas *SmaI* y *Bgl II*, linearizando el vector con *SmaI* y *BamH I*. La mezcla de ligación fue: 50 ng de vector, 100 ng de fragmento, 2 U de T4 ADN ligasa y buffer de reacción. La ligación se realizó en un volumen final de 15 μ L e incubando a 16 °C toda la noche. Para determinar qué colonias tenían el inserto se hizo un mapa de restricción de los plásmidos obtenidos.

Tanto EhS α como EhS2, se expresaron inoculando tres mililitros de cultivo con antibiótico con 3 μ L del cultivo almacenado en glicerol (*E. coli* XL1 Blue pQE30-EhS α ó pQE30-EhS2) e incubando a 37 °C toda la noche con agitación. 100 mL de medio fueron inoculados con 1 mL del precultivo y se dejaron crecer hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6. Posteriormente se indujo por 3 h con 1 mM isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Una vez finalizado el tiempo de inducción las células se transfirieron a dos tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron 5 min a 3000 rpms. El sobrenadante se descartó y la pastilla bacteriana se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis (8 M urea, 100 mM Tris-HCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol, pH 8) y se dio un vórtex suave por 2 min. Finalmente el lisado se clarificó centrifugando 15 min a 10 000 rpms y filtrando por 0.2 μ m.

Purificación. Las proteínas, EhS α y EhS2, se purificaron por medio de cromatografía de afinidad a metales. La purificación de proteínas producidas a partir del vector pQE30 se realizó siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante (The QIAexpressionist, 1997).

El grado de pureza de la proteína purificada fue determinado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Los geles se migraron en buffer de tanque (25 mM Tris, 19 mM glicina, 0.1 % SDS, pH 8.6). El porcentaje de acrilamida del buffer del gel separador (1.5 M Tris, 0.4 % SDS, pH 8.8) varió de 10 a 15 %, el cual se preparó a partir de una solución stock de acrilamida (30 % Acrilamida, 0.8 % bis-acrilamida). Las muestras proteicas se disolvieron en buffer de carga para SDS-PAGE (10 % glicerol, 2.5 % SDS, 50 mM Tris pH 6.8, 5 % β -ME, 0.002 % azul de bromofenol) y se hirvieron por 5 min. Las electroforesis se llevaron a cabo en cámaras MiniProtean III de BioRad.

Por último, las proteínas se dializaron contra 100 volúmenes de PBS y cuantificaron por Abs₂₈₀ (1 U de Abs₂₈₀ equivale a 1 mg/ml de proteína).

Producción de anticuerpos policlonales.

Para la producción de anticuerpos específicos contra las subunidades del proteasoma, EhS α y EhS2, se siguieron los esquemas de inmunización que se muestran en las tablas 2 y 3. Antes de iniciar los esquemas de inmunización se obtuvo suero de los conejos, el cual se utilizó como control de la respuesta contra los inmunógenos. Se utilizaron dos conejos New Zeland White por inmunógeno. Como inmunógeno se utilizaron las proteínas recombinantes puras.

Tabla 2. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales específicos contra EhS α en conejo.

Día post-inmunización	Dosis [Tipo de adyuvante]	Sangría
1	100 μ g. Completo de Freund	
8	100 μ g. Incompleto de Freund	
14	100 μ g. Incompleto de Freund	
21		Primera sangría
29	100 μ g. Incompleto de Freund	
36	100 μ g. Incompleto de Freund	
56		Segunda sangría
63	250 μ g. Incompleto de Freund	
70		Tercera sangría

Tabla 3. Esquema de inmunización para la producción de anticuerpos policlonales específicos contra EhS2 en conejo.

Día post-inmunización	Dosis [Tipo de adyuvante]	Sangría
1	100 μ g. Completo de Freund	
8	100 μ g. Incompleto de Freund	
15	100 μ g. Incompleto de Freund	
21		Primera sangría
29	100 μ g. Incompleto de Freund	
36		Segunda sangría
56	100 μ g. Incompleto de Freund	
63		Tercera sangría
70	100 μ g. Incompleto de Freund	
77		Cuarta sangría
84	100 μ g. Incompleto de Freund	

La valoración de los títulos de los anticuerpos a partir de los sueros se llevó a cabo por la técnica de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC) de 96 pozos con 100 μ L de una solución 5 μ g/mL de EhS α o EhS2 en buffer carbonato de sodio 0.1 M pH 9.5. Esta solución se adicionó a todos los pozos menos a la columna 12 y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron los pozos 3 veces con 200 μ L/pozo de solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Los sitios de adsorción restantes se bloquearon con 150 μ L de solución de bloqueo (50 mM Tris/HCl pH 8, 0.5 % Gelatina, 0.2 % Tween 20) durante 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros con una dilución inicial de 1:10 en buffer de reacción. En cada pozo se adicionaron 100 μ L de la solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0.1 mg/ml Gelatina, 0.05 % Tween 20) y se mezclaron con 50 μ L/pozo de la dilución del suero para hacer las diluciones seriadas hasta la columna 10, dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó. Se adicionaron 100 μ L/pozo del segundo anticuerpo (anticonejo, Zymed) conjugado a la enzima peroxidasa (HRP), diluído 1:2500 en buffer de reacción y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se hizo otro lavado. La reacción se reveló con 100 μ L/pozo de sustrato ABTS (Boehringer) y peróxido de hidrógeno, el cual se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 25 μ L/pozo de ácido fluorhídrico (50 %). La absorbancia fue registrada a 405 nm en un lector de microplacas de ELISA BIO-RAD 550. Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, éstas se trataron estadísticamente con el programa GraphPad Prism (versión 2). Para el ajuste se utilizó la subrutina para ajuste no lineal de curvas sigmoides.

Los anticuerpos policlonales del suero hiperinmune se enriquecieron mediante una precipitación con sulfato de amonio (Research Organics), a una concentración final de 50 %. El precipitado se resuspendió en un volumen de PBS y se dializó contra el mismo buffer utilizando membranas de 12,000-14,000 Da de exclusión molecular.

Purificación de anticuerpos policlonales.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad. Para el caso de los anticuerpos anti-EhS α , se utilizó Sefarosa activada con bromuro de cianógeno como resina (Sigma). Se pesaron 0.35 g de resina y se hincharon en 1 mM HCl por 15 min. Posteriormente la resina se filtró, lavó con la misma solución y se secó. La resina se mezcló con la solución de la proteína recombinante EhS α (buffer 0.1 M Bicarbonato de Sodio, 150 mM NaCl pH 8) y se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente con agitación. La cantidad de proteína unida a la resina se determinó por absorbancia a 280 nm, comparando la lectura del sobrenadante antes y después del acoplamiento. Una vez preparada la resina se empacó en una columna y se equilibró con 5 volúmenes de 0.1 M Tris-HCl pH 8. En seguida se recircularon tres veces los anticuerpos por la columna. Se hizo un primer lavado con 5 volúmenes de 0.1 M Tris-HCl pH 8 y luego con 5 volúmenes de 0.1 M Tris-HCl, 500 mM NaCl pH 8. Por último, los anticuerpos se eluyeron con 0.1 M ácido acético y se colectaron en fracciones de 500 μ L, las cuales se mezclaron inmediatamente con 1 mL de 1 M Tris-HCl pH 8.

La purificación por cromatografía de afinidad de los anticuerpos anti-S2, se realizó utilizando Thiopropyl-Sefarosa 6B como resina (Pharmacia). Se pesaron 0.35 g de resina y se hincharon en PBS por 15 min. Posteriormente la resina se filtró, lavó con la misma solución y se secó. La resina se mezcló con la solución de la proteína recombinante EhS2 (buffer 6 M urea, 1 mM EDTA en PBS) y se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente con agitación. La cantidad de proteína unida a la resina se determinó por absorbancia a 280 nm, comparando la lectura del sobrenadante antes y después del acoplamiento. Una vez preparada la resina se empacó en una columna y se equilibró con 5 volúmenes de 6 M urea, 1 mM EDTA en PBS. En seguida se recircularon tres veces los anticuerpos por la columna. Se hizo un primer lavado con 5 volúmenes de 0.1 M Tris-HCl pH 8 y luego con 5 volúmenes de 0.1 M Tris-HCl, 500 mM NaCl pH 8. Por último, los anticuerpos se eluyeron con 0.1 M ácido acético y se colectaron en fracciones de 500 μ L, las cuales se mezclaron inmediatamente con 1 mL de 1 M Tris-HCl pH 8.

Caracterización de los anticuerpos policlonales.

La especificidad de los anticuerpos purificados se evaluó mediante Western blot cualitativo. En geles de acrilamida se cargó el lisado total equivalente a 100,000, 50,000 y 25,000 amibas, como control se utilizaron 100 ng de la proteína recombinante. Los lisados totales de trofozoítos de *E. histolytica* se prepararon mediante lisis en buffer de carga (10 % glicerol, 2.5 % SDS, 50 mM Tris pH 6.8, 5 % β -ME, 0.002 % azul de bromofenol) conteniendo 2.5 mM de PMSF y 500 μ M de E64 (Roche) y ebullición a 100 °C, durante 10 min.

Western blot cualitativo. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 5 minutos en el buffer de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris-Base, 0.037 % SDS y 20 % metanol). La membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) se equilibró 10 min en el buffer de transferencia. Se montó el sandwich de tal forma que el gel y la membrana quedaran entre seis papeles filtro Whatman #1 y la membrana hacia el ánodo. Se transfirió durante 1 hora a 400 mA, corriente constante, en una cámara de electrotransferencia semi-seca HEP-1 (OWL). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó 2 horas a temperatura ambiente en agitación, con una solución 5 % de leche descremada en polvo/TBST (10 mM Tris HCl pH 7, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) La detección se llevó a cabo con 2 μ g/mL de anticuerpo específico en 0.1 % leche en polvo/TBST por 1 h a temperatura ambiente y agitación. El anticuerpo que no hubiese reaccionado se descartó con tres lavados de TBST de 10 min cada uno. La membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente y agitación con el segundo anticuerpo (cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina) (ZYMED) diluído 1:2500 en 0.1 % leche en polvo/TBST. Por último, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min y se reveló la reacción con NBT/BCIP en buffer de reacción (100 mM Tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl y 10 mM MgCl). El revelado se detuvo con 5 mM EDTA.

Inmunocitocalización.

Trofozoítos de *E. histolytica* fueron incubados sobre cubreobjetos durante 2 h a 37 °C en una cámara anaeróbica. Posteriormente, se fijaron durante 30 min a 37 °C en una solución 4% paraformaldehído/PBS. Después de 3 lavados con PBS, las células se permeabilizaron con una solución al 0.2 % Tritón X-100/PBS durante 10 min y se bloquearon durante 1 h en una solución 5 % leche descremada (Nestlé)/PBS. Se incubó 1 h con el primer anticuerpo (anti-EhS α , anti-EhS2, anti-EhSec61 o anti-Ehamibaporo) en PBS a una concentración final de anticuerpo de 5 μ g/mL. Se aspiró la solución y se lavó 3 veces (10 minutos cada vez) con PBS. Posteriormente se incubó 1 h con un anticuerpo anti-conejo acoplado al fluoróforo Alexa 488 (o Alexa 568), diluído 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 con RNAsa A libre de DNAsa (100 μ g/ml) durante 20 min y después 5 min con 2 μ g/mL de Ioduro de Propidio en PBS. Como último paso las muestras se montaron sobre un portaobjeto en el medio de montaje VectaShield (Vecta Laboratories). Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio confocal Bio-Rad MRC 600 y en un Nikon E600 equipado para epifluorescencia.

Anticuerpos anti-Sec61, anti-CP5 y anti-amibaporo.

Los anticuerpos contra Sec61, CP5 y Amibaporo, fueron amablemente proporcionados por la Dra. Rosana Sánchez, el M. en C. Andres Saralegui y Augusto López, respectivamente.

Ensayos de permeabilidad de los PNAs.

Trofozoitos expuestos a PNA (PNAs derivatizados con biotina) y sin tratar fueron adheridos a cubreobjetos durante 2 h a 37 °C en una cámara anaeróbica. Posteriormente, se fijaron durante 30 min a 37 °C en una solución 4% paraformaldehído/PBS. Después de 3 lavados con PBS, las células se permeabilizaron con una solución al 0.2 % Tritón X-100/PBS, durante 10 min y se bloquearon durante 1 h en una solución 5 % leche descremada (Nestlé)/PBS. Se incubaron 1 h con estreptavidina-Alexa 488 en PBS a una concentración final de 1 µg/mL. 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 tras tratar con RNAsa. Por último las muestras se montaron sobre un portaobjeto en el medio de montaje Vecta Shield. Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio confocal Bio-Rad MRC 600.

Ensayos de la proliferación de trofozoítos.

Para los ensayos de proliferación se utilizaron inóculos de 10,000 amibas por 5 mL de medio Bi-S. Se partió de un cultivo con aproximadamente 1,000,000 (en 10 mL) de amibas que se centrifugó por 5 min a 2 000 rpm y se resuspendió en 1 mL de medio. Las amibas se contaron al microscopio y se determinó el volumen necesario para tomar 10,000 amibas, el cual se adicionó a un tubo y se aforó a 5 mL con medio.

Una vez que se tuvieron los tubos con el inóculo deseado se les adicionó la dosis de PNA deseada (1, 2, 5, 10 y 20 μ M) de antisentido así como de *scrambled*. Cada dosis fue ensayada por triplicado. Terminado el tiempo de tratamiento, las amibas se pasaron a un tubo cónico de 15 mL, se lavaron una vez con 5 mL de PBS frío y se centrifugaron por 5 min a 2,000 rpm. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 500 μ L de PBS frío. Se tomaron 20 μ L y se mezclaron con 20 μ L de Trypan Blue para contar en un hemocitómetro aquellas células que fueran impermeables al colorante (células viables). En todos los ensayos la viabilidad de las células fue de más del 95 %.

Medición de los niveles de proteína de trofozoítos.

Después de contar las amibas (Proliferación), éstas se resuspendieron en PBS frío a una densidad de 2×10^6 células/mL, se mezclaban con un volumen igual de buffer de lisis 2x (10 % Glicerol, 2.5 % SDS, 50 mM Tris HCl pH 6.8, 0.5 mM E64, 5 mM PMSF) y se lisaron por agitación en vórtex durante 30 seg.

Medición de proteína (BCA). Se utilizó el método del ácido bicinonínico por medio del Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). En cada ensayo se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Las muestras se normalizaron por cantidad de proteína con buffer de lisis 1 X para los Western blots cuantitativos.

Western blot cuantitativo. Finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 5 min en el buffer de transferencia (10 mM CAPS, 10 % metanol, pH 11). La membrana de difluoruro de polivinilo (*Immobilon P*, Millipore) se sumergió durante 5 min en metanol absoluto y luego se equilibró 10 min en el buffer de transferencia. Se montó el sandwich de tal forma que el gel y la membrana quedaran entre 2 papeles filtro Whatman #1 y la membrana hacia el ánodo. Se transfirió en inmersión durante 2 h con agitación a 40 V, voltaje constante, en una cámara de electrotransferencia de inmersión (Hoeffer Scientific). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó con 5 % leche en polvo/TBST (10 mM Tris HCl pH 7, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) por 2 h a temperatura ambiente y agitación. La detección se llevó a cabo con 2 µg/mL de anticuerpo específico en 0.1 % leche en polvo/TBST, por 1 h en agitación. El anticuerpo que no hubiese reaccionado se descartó con tres lavados de TBST de 10 min cada uno. La membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitación con el segundo anticuerpo (cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina) (ZYMED) diluido 1:2500 en 0.1 % leche en polvo/TBST. Por último, se lavó la membrana 3 veces durante 10 min y se reveló la reacción con NBT/BCIP en tampón de reacción (100 mM Tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl y 10 mM MgCl). El revelado se detuvo con 5 mM EDTA. Después que se reveló la membrana, se cuantificó la cantidad de Sec61 de cada muestra por densitometría utilizando el programa NIH Image 1.62.

Transcripción *in vitro*.

Producción de transcritos de Sec61 para los ensayos de traducción *in vitro*. Para la producción de ARN, el gen de Sec61 se clonó en los plásmidos pBSSK, pCITE4a y pCITE4c. En todos los casos el plásmido se linearizó previamente a la transcripción, de tal manera que el gen se transcribiera por completo (*Xba I*-pBSSK, *Pme I*-pCITE4a y *Pme I*-pCITE4c).

Clonación en pBSSK. El fragmento fue clonado en los sitios *BamH I*-*Xba I* en el plásmido pBSSK. Se incubaron 30 ng de vector linearizado, 60 ng de EhSec61, 2 U de T4 ADN ligasa (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 15 µL toda la noche a 16 °C.

Clonación en pCITE4a. El fragmento fue clonado en los sitios *BamH I*-*Not I* en el plásmido pCITE4a. Se incubaron 80 ng de vector linearizado, 25 ng de EhSec61, 2 U de T4 ADN ligasa (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 15 µL toda la noche a 16 °C.

Clonación en pCITE4c. El fragmento fue clonado en los sitios *BamH I*-*Bgl II* en el plásmido pCITE4c. Se incubaron 45 ng de vector linearizado, 200 ng de EhSec61, 2 U de T4 ADN ligasa (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 15 µL toda la noche a 16 °C.

Transcripción. La mezcla de transcripción fue la siguiente: 1 µg de ADN linearizado, 20 U de T7 ARN polimerasa, 1 mM de ribonucleótidos, 40 U de inhibidor de RNAsa y buffer de transcripción. Se incubó por 2 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla se incubó 15 min a 37 °C con 20 U de DNasa I. El ARN fue extraído con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y centrifugado a 14,000 rpms por 10 min a 4 °C; seguido de una precipitación alcohólica, con tres volúmenes de etanol absoluto, y otra centrifugación a 14,000 rpm durante 20 min, a 4 °C. La pastilla de ARN se lavó con 2 mL de etanol al 80 % y se resuspendió en 15 µL de agua tratada con 0.1% dietilpirocarbonato. El ARN se caracterizó en un gel de agarosa al 1.5 % y se cuantificó con RiboGreen (Molecular probes) siguiendo el protocolo del fabricante.

Producción de transcritos biotinilados de Sec61 para los ensayos de cinética de hibridación en fase sólida (Biacore). Para la producción de ARN, el gen de Sec61 se clonó en el plásmido pBSSK, el cual se linearizó previamente a la transcripción con la enzima *BstX I*, de tal manera que se transcribieran sólo los primeros 250 nucleótidos. En este caso, la transcripción se llevó a cabo utilizando una mezcla de ribonucleótidos que contenía Biotina-16-UTP.

Clonación en pBSSK. El fragmento fue clonado en los sitios *BamH I*-*Xba I* en el plásmido pBSSK. Se incubaron 30 ng de vector linearizado, 60 ng de

EhSec61, 2 U de T4 ADN ligasa (Roche) y buffer de reacción, en un volumen final de 15 μ L toda la noche a 16 °C.

Transcripción. La mezcla de transcripción fue la siguiente: 1 μ g de ADN linearizado, 20 U de T7 ARN polimerasa, ribonucleótidos (1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP y 0.35 mM Biotina-16-UTP), 40 U de inhibidor de RNAsa y buffer de transcripción. Se incubó por 2 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla se incubó 15 min a 37 °C con 20 U de DNasa I. El ARN fue extraído con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y centrifugado a 14,000 rpms por 10 min a 4 °C; seguido de una precipitación alcohólica, con tres volúmenes de etanol absoluto, y otra centrifugación a 14,000 rpms durante 20 min a 4 °C. La pastilla de ARN se lavó con 2 mL de etanol al 80 % y se resuspendió en 15 μ L de agua tratada con 0.1% dietilpirocarbonato. El ARN se caracterizó en un gel de agarosa al 1.5 % y se cuantificó con RiboGreen (Molecular probes) siguiendo el protocolo del fabricante.

Ensayos de cinética de hibridación en fase sólida (Biacore).

Para iniciar los estudios de Biacore, el chip (SA, Biacore, derivatizado con estreptavidina) se dejó estabilizar a temperatura ambiente por media hora y se lavó tres veces con 100 μ L de 50 mM NaOH y un flujo de 100 μ L/min.

El chip consta de dos celdas, de las cuales una no se modificó y se utilizó como referencia para medir las interacciones de los PNAs con el sustrato (estreptavidina) del chip. La otra celda se modificó utilizando como ligando un transcrito biotinilado de 250 nucleótidos (ver, Producción de transcritos de Sec61 para los ensayos de cinética de hibridación en fase sólida (Biacore)), el cual se acopló al chip disuelto en 300 mM NaCl/agua, utilizando un flujo de 5 μ L/min. Con la idea de saturar todos los sitios de unión de la celda, se realizaron inyecciones con la solución de ARN hasta que la respuesta en el sensograma no aumentó y la cual se dejó estabilizando toda la noche.

Los PNAs se ensayaron disueltos en agua, a 25 °C y con un flujo de 30 μ L/min. Para reestablecer la línea base, después de cada ensayo se hicieron lavados con 100 μ L de 5 mM NaOH. Las interacciones específicas se determinaron restando el incremento de la línea base de la celda de referencia al incremento de la línea base de la celda modificada con el ARN.

Purificación de ARN poli (A) de amiba.

Primeramente se purificó ARN total utilizando Trizol (GIBCO). Se cosecharon 8 botellas (120×10^6 amibas) de 200 mL en tubos de 50 mL. La pastilla celular se resuspendió en 17 mL de Trizol, se lisó con un vórtex suave de 1 min y se dejó 2 h a 4 °C. Se adicionaron 3.4 mL de cloroformo, se dejó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4 °C. La fase acuosa se precipitó durante 10 min con un volumen de isopropanol y se centrifugó a 12 000 g por 20 min a temperatura ambiente. El precipitado se lavó 2 veces con etanol frío al 80 % y por último se resuspendió en 3 mL de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl, 0.1 % SDS, pH 7.5. La solución de ARN total se calentó por 5 min a 70 °C, se enfrió en hielo durante 5 min y se determinó la concentración por absorbancia a DO_{260} (40 $\mu\text{g/mL}$ es equivalente a 1 DO_{260}).

Para separar la fracción de ARN poli (A), la solución de ARN total se recirculó 3 veces por una columna de Oligo-dT celulosa (BRL). El ARN no unido se lavó con 4 mL del buffer de unión (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl, 0.1 % SDS, pH 7.5). El ARN poli (A) se eluyó con 1.5 mL del buffer de elución (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, pH 7.5), se calentó durante 5 min a 70°C, se enfrió en hielo por 5 min y se dejó 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 90 μL de una solución 5 M NaCl y se pasó por la columna Oligo-dT celulosa. Se lavó con 4 mL de buffer de unión y se eluyó con 1.5 mL de buffer de elución. Se le adicionaron 90 μL de una solución 5 M NaCl y 3 mL de etanol frío y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Por último, la muestra de ARN poli (A) se centrifugó a 7000 g por 20 min a 4 °C, se lavó dos veces con etanol frío y se resuspendió en 50 μL agua tratada con dietilpirocarbonato. El ARN poli (A) se caracterizó en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificó con el kit RiboGreen (Molecular probes) siguiendo el protocolo del distribuidor.

Purificación del ARN de EhSec61 de amiba.

El ARNm de EhSec61 de amiba se trató de purificar a partir de ARN poli (A), por medio de captura en fase sólida. Como sonda de captura se utilizó el plásmido pBSSK-Sec61 (15 µg) (ver Transcripción *in vitro*), el cual se linearizó con la enzima *Hind III*, se hirvió 3 min a baño maría, se depositó en membrana de nitrocelulosa, se dejó secar y se horneó por 2 h a 80 °C. Posteriormente, se adicionó el ARN poli (A) (10 µg) en buffer de hibridación (SSC 6 X) y se incubó toda la noche a 37 °C. El ARN se eluyó con 20 µL de agua y se cuantificó con el kit RiboGreen (Molecular probes) siguiendo el protocolo del distribuidor.

Traducción *in vitro*.

Los ensayos de traducción *in vitro* mediante lisados de reticulocitos de conejo tratados con nucleasa de micrococo se realizaron utilizando ARN poli (A) de amiba, así como el ARN del gene EhSec61 de amiba y el transcrito *in vitro*. Como control se utilizó el ARN de luciferasa que se incluye en el kit. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante (Promega). El ARN se desnaturalizó durante 5 min a 70 °C, se enfrió 5 min en hielo y se preincubó 30 min a 37 °C con 1 µM de PNA. Posteriormente, éste se incubó durante 90 min a 30 °C con 35 µL del lisado de reticulocitos de conejo, 1 µL de la mezcla de aminoácidos (sin metionina), 0.01 mCi de Met[³⁵S] y 40 U de inhibidor de RNAsa.

Autorradiografía-Densitometría. De la mezcla de traducción se tomaron 5 µL, los cuales se mezclaron con 15 µL de buffer de carga para SDS-PAGE (10 % glicerol, 2.5 % SDS, 50 mM Tris pH 6.8, 5 % β-ME, 0.002 % azul de bromofenol) y se hirvieron durante 10 min en baño maria. Las muestras se migraron en geles del 10 %. Al finalizar la electroforesis el gel se montó en un *cassette* para autorradiografía digital (Molecular Dynamics) y se reveló de 5 a 10 días. Una vez que se reveló el gel, se cuantificó la cantidad de Sec61 de cada muestra por densitometría utilizando el programa NIH Image 1.62.

Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). De la mezcla de traducción se tomaron 2 µL, los cuales se mezclaron (vórtex) con 98 µL de 1 M NaOH/2 % H₂O₂ y se incubaron 10 min a 37 °C. Las proteínas se precipitaron con 900 µL de ácido tricloroacético 25 %/2 % cas-aminoácidos frío durante 30 min en hielo. Posteriormente, se colectaron por filtración 250 µL de la precipitación en filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman), se lavaron con 6 mL de TCA al 5 % frío, se trataron con 2 mL de acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Medición de la incorporación de Met[³⁵S] en material precipitable. Una vez secos los filtros con el material precipitado, se pasaron a frascos de centelleo y se les adicionó 1 mL de líquido de centelleo. Las muestras se analizaron en un contador Beckman LS6000IC y se reportaron en cuentas por minuto (cpm)

Estudios de FACs.

Inóculos de 10,000 amibas en 5 mL de medio BI-S-33 se incubaron por separado sin PNA, con 20 μ M PNA *scrambled* y 20 μ M PNA antisentido contra Sec61 por 96 h a 37 °C. Se centrifugaron 5 min a 2000 rpm, el sobrenadante se descartó y las células se fijaron con 2 mL de una solución 4 % paraformaldehído/PBS durante 30 min a 37 °C. Las células se lavaron y se bloquearon por una hora a 37 °C con una solución 50 mM cloruro de amonio pH 7.5. Se hizo otro lavado y las células se incubaron por una hora a temperatura ambiente con 1 mL de la solución de anticuerpo específico (anti-amibaporo o anti-CP5) a 10 μ g/mL. Después de un lavado, las células se incubaron con 1 mL de una solución 1 μ g/mL del segundo anticuerpo (cabra anti-conejo-alexa 488) por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células y se resuspendieron en 1 mL de PBS. El análisis fluorescente de las células se realizó en un FACs Becton Dickinson utilizando el programa CellQuest. El tamaño de la muestra fue de 10,000 eventos.

Mediciones de la T_m de los híbridos PNA/ADN.

Las determinaciones de la T_m de los híbridos PNA/ADN se llevaron a cabo utilizando como molécula blanco un oligómero de ADN, el cual era complementario a la secuencia del PNA antisentido y de la misma longitud (17mero). Cantidades molares equivalentes de PNA y del oligo de ADN (1 nmol de cada uno) se mezclaron, se incubaron 15 min a 90 °C y se llevaron lentamente a 4°C (2 horas). La curva de hipocromicidad se efectuó de 15 a 90 °C en intervalos de tres grados y tomando lectura a DO₂₆₀. Las lecturas se efectuaron en un espectrometro Beckman DU650i. Los datos se analizaron con el programa Prism Path.

Formación de abscesos hepáticos en hamster.

Para los ensayos de formación de abscesos hepáticos por trofozoítos control y tratados con PNA, se utilizaron 24 tubos por grupo, inoculados con 10,000 amibas por 5 mL de medio y 20 μ M de cada PNA. Estos se incubaron por 96 h a 37 °C. Al término del tiempo de tratamiento, los células se pusieron en hielo por 5 min y se pasaron a tubos de 50 mL, los cuales se centrifugaron 5 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 10 mL de PBS y se contaron en presencia de Trypan Blue. Se volvieron a centrifugar por 5 min a 2000 rpm y se resuspendieron a una concentración final de 1×10^6 amibas por 200 μ L de PBS. Se inocularon, por vía intra-portal, 4 hámsters por grupo (control, antisentido y scrambled) con 1×10^6 amibas por hámster y se mantuvieron en observación por 7 días. Al séptimo día se sacrificaron los animales para extraerles el hígado, los cuales se pesaron, cortaron, fijaron, montaron y seccionaron para su estudio histológico.

En un segundo experimento, se dió un refuerzo intraperitoneal de 1.5 mg/Kg de PNA (en un volumen de 225 μ L) cada 24 h, por 96 h a cada hamster. Los hamsters se intervinieron quirúrgicamente a las 96 h para la extracción del hígado los cuales se procesaron de la misma forma que en el primer experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En lo referente a la expresión y purificación de las proteínas recombinantes de EhS α y EhS2 y la producción y purificación de anticuerpos específicos contra éstas, se decidió solamente anexar el artículo publicado (anexo 2), ya que se utilizaron como herramientas para estudios generales de citolocalización y no como parte esencial del trabajo sobre supresión de la expresión génica mediante PNA.

Síntesis y caracterización de ácidos péptido nucleicos (PNA).

En general, el rendimiento final de cada una de las síntesis de PNA varió dependiendo del tipo de modificación de cada uno de éstos. En todos los casos, el pico mayoritario por HPLC preparativo (Figura 13) de la síntesis cruda, siempre fue el compuesto deseado. La integridad de los PNAs se verificó por espectrometría de masas (Figura 14) y la pureza, que siempre fue mayor del 95%, por HPLC analítico (Figura 15).

El rendimiento de las síntesis de los PNAs sin modificar fue siempre el más alto, variando entre 70-90% y básicamente, la determinante de éste fue la secuencia de los PNAs. Debido a la naturaleza de cada uno de los cuatro monómeros, el acoplamiento de ciertas secuencias de monómeros suelen ser menos eficientes (por ejemplo una secuencia AAAA).

En segundo término, en cuestión de rendimiento, están las síntesis de los PNAs modificados directamente con los ácidos grasos (con y sin lisina como espaciador). Estas síntesis se comportaron casi de igual manera que la de los PNAs sin modificar, ya que tanto la lisina como los ácidos son de un tamaño comparable (incluso menor en el caso de los ácidos) al de los monómeros, por lo que el rendimiento depende exclusivamente de la secuencia de los PNAs. La pequeña diferencia entre los rendimientos de éstas con las síntesis de PNAs sin modificar, radica en la longitud del conjugado (dos o un acoplamiento más, con y sin lisina respectivamente). Cada acoplamiento al no ser del 100 % disminuye el rendimiento final de la síntesis.

En el caso de las síntesis de los conjugados de PNA con colesterol hemisuccinato y ácido cólico, éstas fueron incompatibles con la química utilizada (tboc). Se determinó, por espectrometría de masas, que el esteroles era susceptible a degradación en las condiciones ácidas de ruptura utilizadas, TFMSA:TFA:m-Cresol (2:8:1). Debido a que fue imposible purificar estos conjugados se descartaron del estudio.

El rendimiento de las síntesis de los conjugados de PNAs con cistina-1,2-diaminoetano (Linker) fue bajo. El paso limitante de estas síntesis fue la separación del conjugado de la resina. Durante la ruptura ácida (TFMSA:TFA:m-cresol), aproximadamente el 40 % del material se redujo, generando las formas PNA-cisteína y cisteína-1,2-diaminoetano. En general, el rendimiento promedio final de estos conjugados fue alrededor del 50 %. Cuando a éstos se les acopló el ácido mirístico (PNA-cistina-1,2-diaminoetano-miristato) el rendimiento de la síntesis no varió.

La síntesis del conjugado PNA-cistina-1,2-diaminoetano-penetrina fue la que presentó el rendimiento más bajo. Esto se debe a que sumado al problema de la reducción durante la separación del conjugado de la resina, fue la síntesis más larga: 34 acoplamientos; una primera parte de 17 acoplamientos para la secuencia del PNA, un acoplamiento intermedio de la cistina-1,2-diaminoetano y 16 acoplamientos peptídicos de la secuencia del péptido de penetrina. Aún cuando se logró la síntesis completa de este conjugado (determinado por espectrometría de masas), éste no se logró purificar por HPLC, ya que el fragmento peptídico producido por la reducción durante la ruptura de la resina (cisteína-1,2-diaminoetano-penetrina), coeluyó con el conjugado completo (PNA-cistina-1,2-diaminoetano-penetrina). Como una alternativa a la purificación por HPLC, este conjugado se trató de purificar por FPLC pero sin éxito, por lo que no se utilizó en este estudio.

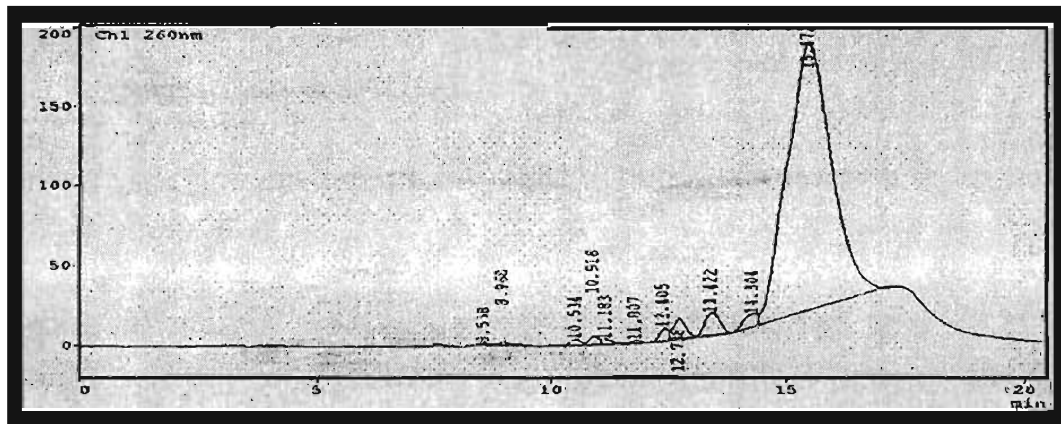


Figura 13. Cromatograma de HPLC preparativo representativo de las síntesis crudas de PNAs.

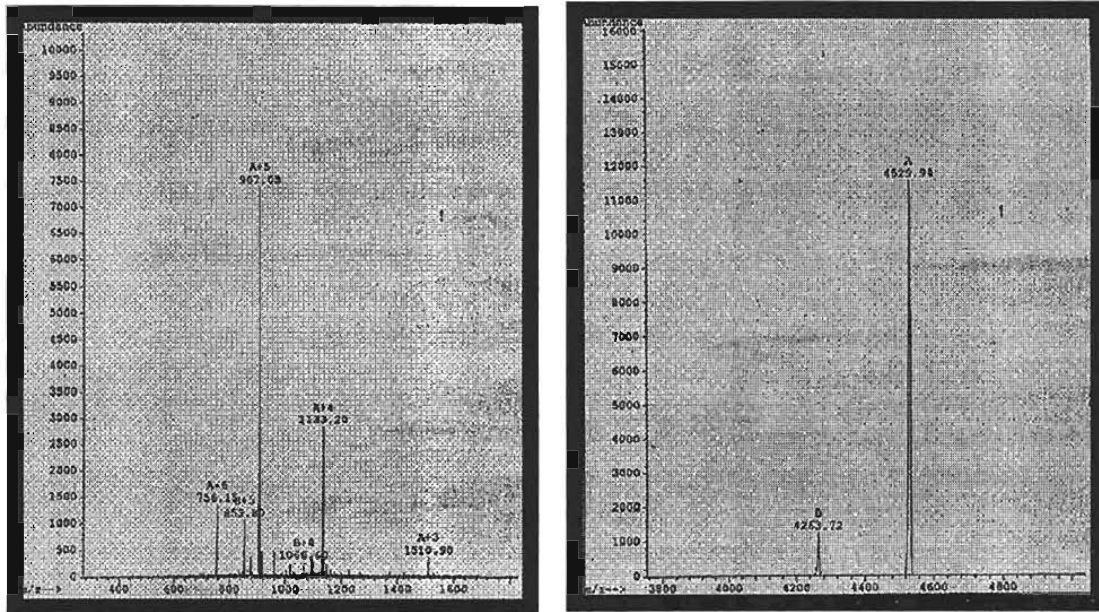


Figura 14. Espectro de masas representativo de las síntesis de PNAs. Izquierda, espectro en bruto (m/z); Derecha espectro deconvolucionado.

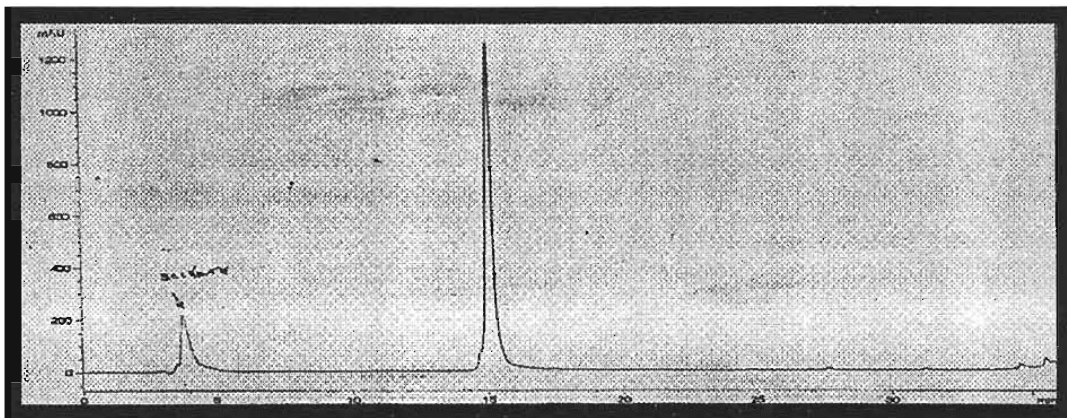


Figura 15. Cromatograma de HPLC analítico representativo de las síntesis de PNAs. La pureza de todos los PNAs fue siempre mayor al 95 %.

Permeabilidad de PNAs a trofozoitos de *Entamoeba histolytica*.

Uno de los objetivos finales de este trabajo contempla la utilización de PNAs en ensayos *in vivo* (hámsters). Para ésto, se requiere de una administración repetida (para mantener la dosis efectiva) de PNA, necesitando de una cantidad de material considerable. La dosis efectiva de PNAs en estudios en células en cultivo varía de una concentración de entre 10-20 μM , si bien en tubos de 5 mL esto no es un problema, al extrapolarlo al hámster se genera una limitante de material. Con esta perspectiva, decidimos modificar los PNAs con moléculas acarreadoras que aumentarían la permeabilidad de los PNAs a los trofozoítos.

Como primera alternativa decidimos modificar los PNAs con colesterol, ya que se ha reportado que es el esteroide (y lípido) más abundante en la membrana plasmática de *Eh*. Además, es esencial para el crecimiento normal del parásito y los trofozoítos son incapaces de sintetizarlo *de novo*, satisfaciendo su requerimiento mediante la ingesta de colesterol del medio (Lujan, 1997; Das, 2002). Al llevar a cabo la síntesis de estos conjugados, se determinó que la química utilizada no fue compatible (ver síntesis y caracterización de PNAs).

Siguiendo la misma dirección, se decidió utilizar los ácidos palmítico y mirístico, los cuales son los ácidos grasos saturados más abundantes en *Eh* (Lujan, 1997). Al comparar la permeabilidad de PNAs sin modificar y modificados, en proyecciones de máxima intensidad obtenidas por microscopía confocal (Figura 16), observamos que la señal de los PNAs modificados con miristato es, por lo menos, 100 veces mayor que la de los PNAs sin modificar. Se obtuvieron resultados comparables con los conjugados con palmitato.

La distribución subcelular parcialmente difusa con áreas de alta concentración del PNA sin modificaciones con ácidos grasos (Figura 16, panel C), es consistente con resultados reportados previamente por nuestro grupo (Stock 2001). Cabe mencionar que no se observó una localización nuclear significativa de estos PNAs, en contraste con reportes previos, que propusieron que la simple adición covalente de biotina a PNAs resulta en una distribución nuclear (Chinnery, 1999).

En un segundo experimento se decidió bajar la concentración del PNA a 1 μM y aumentar el tiempo de incubación. La figura 17 muestra trofozoítos después de 24 h de incubación con los diferentes PNAs. La captación celular de los conjugados fue esencialmente la misma, con la excepción del conjugado B-K-*scrambled*-palmitato, el cual mostró una internalización menor (Figura 17, panel F). Esta baja difusibilidad puede ser dependiente de secuencia, lo cual se ha observado para otros conjugados PNA-Lipofílicos (Ljungstrom, 1999), como consecuencia de una solubilidad diferencial en el medio de cultivo debido a una probable formación de agregados.

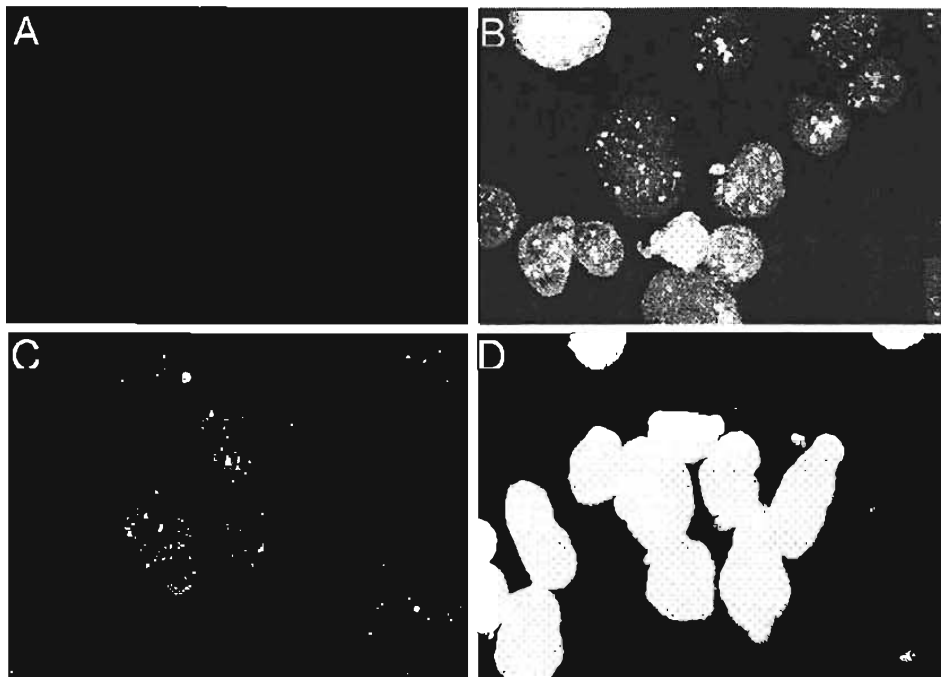


Figura 16. Permeabilidad relativa de trofozoítos de *E. histolytica* a 17-meros de PNA sin modificar y modificados con miristato. Proyecciones confocales de máxima intensidad de trofozoítos incubados 2 h con (A) 10 μM de B-K-antisentido, (B) 10 μM de B-K-antisentido-miristato, y (C, D) 10 μM de los *scrambled* correspondientes. Potencia de laser a 1 % para A y B y 100 % para C y D.

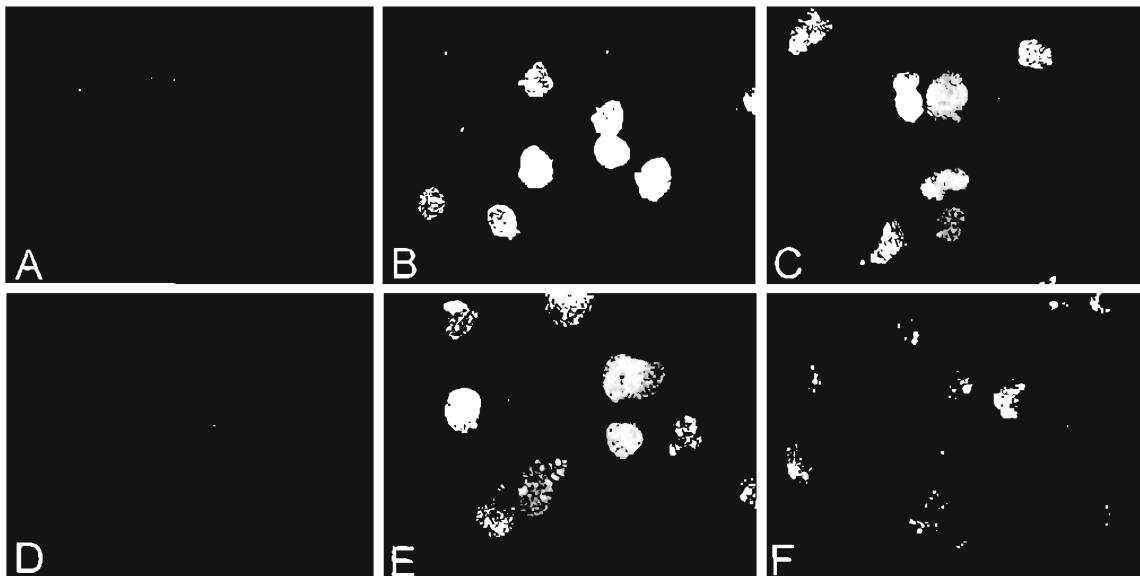


Figura 17. Comparación de la permeabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* a PNAs 17-meros sin modificar y modificados con miristato y palmitato. Proyecciones confocales de máxima intensidad de trofozoítos incubados 24 h con (A) 1 μM de B-K-antisentido, (B) 1 μM de B-K-antisentido-miristato, (C) 1 μM de B-K-antisentido-palmitato, (D) 1 μM de B-K-*scrambled*, (E) 1 μM de B-K-*scrambled*-miristato, (F) 1 μM de B-K-*scrambled*-palmitato. Potencia de laser 30 %.

Debido a esta observación, se decidió eliminar a los conjugados con palmitato de los estudios de inhibición, ya que una inhibición inespecífica del conjugado B-K-PNA-palmitato antisentido podría ser enmascarada por una baja permeabilidad del *scrambled* correspondiente.

Para determinar la distribución subcelular de los PNAs-miristato en *Eh*, se hicieron reconstrucciones 3D de trofozoítos con los dataset de microscopía confocal (el mismo dataset de la figura 16). Cinco cortes ecuatoriales de una ameba incubada por 2 h con 10 μM de este PNA se muestran en la figura 18. Básicamente, la distribución subcelular de los PNAs se restringe al citosol, ya que no se detectó señal significativa en el núcleo. Esta distribución citosólica propone que la captación del PNA no es dependiente de endocitosis, ya que la señal no parece concentrarse en vesículas. Además, interesantemente, la localización subcelular no es a nivel de membrana plasmática, como se esperaría debido a la naturaleza de la molécula acarreadora (miristato).



Figura 18. Distribución subcelular del B-K-PNA-miristato en trofozoítos de *E. histolytica*. Reconstrucción 3D, de una ameba, generada con el dataset del confocal. Cinco cortes ecuatoriales de una ameba incubada 2 h con 10 μM del B-K-PNA-miristato. La flecha indica la capa lipídica externa de la ameba. Escala RGB (Red, Green and Blue) continua describe la concentración del PNA; Rojo mayor concentración, Verde concentración media y Azul baja concentración.

Como otra alternativa, para incrementar la permeabilidad de los PNAs, se decidió derivatizarlos con el péptido membrano-activo penetrina. Este péptido se ha utilizado con éxito como agente acarreador de PNAs en células de mamífero (Villa, 2000) ya que es capaz de difundir y acarrear moléculas a través de la membrana plasmática de una manera receptor-independiente. Además, se ha reportado que la forma retro-inversa, resistente a degradación por proteasas, (se utilizan D aminoácidos y se invierte la orientación del amino y carboxilo terminal) retiene la actividad penetrante (Lindgren, 2000). Esta última propiedad es de vital importancia para nuestro sistema, ya que la ameba al secretar una cantidad importante de proteasas, degradaría la fracción peptídica del conjugado PNA-penetrina antes de la internalización de éste. Como se mencionó anteriormente, aunque se logró sintetizar este conjugado, no se pudo purificar.

Ensayos de la proliferación y niveles de proteína de trofozoítos.

Ensayos con PNA sin modificar. Cultivos de trofozoítos en fase exponencial se incubaron por separado 96 h con o sin 20 μ M de los PNAs antisentido no modificados contra los ARNm de EhSec61, EhS α y EhS2 y sus *scrambleds* correspondientes.

Como se puede observar en la figura 19, la proliferación de los trofozoítos se afectó poco al ser tratados con el PNA contra EhS2. La inhibición a nivel de proteína no se pudo determinar, ya que durante el procesamiento de las muestras, la proteína EhS2 se degradó rápidamente. Aún cuando se trató de modificar el procesamiento de las muestras para lograr su medición, no se logró encontrar las condiciones óptimas, lo que invalidó la utilización de este PNA.

Cuando los trofozoítos se trataron con el PNA contra EhS α , no se afectó significativamente ni la proliferación ni los niveles de la proteína con respecto al control y *scrambled* (Figura 20). Aunque en este caso se observó un decremento de la proteína en las muestras antisentido, éste no es significativo, ya que la desviación estándar de éstas sobrelapa con la del *scrambled*.

En el caso de la inhibición de la proteína Sec61, la densitometría de muestras por triplicado reveló un decremento específico que, en diferentes experimentos, varió alrededor de un 65%, lo cual, además, correlacionó con una disminución de la proliferación del 50 % con respecto al control y *scrambled* (Figura 21). Cabe añadir que estos experimentos fueron repetidos numerosas veces, ya que se utilizaron como control para estudios de los PNAs derivatizados (ver más adelante), y la disminución de los niveles de Sec61 osciló siempre entre 65% y 80%.

La diferencia de inhibición observada con estos tres PNAs puede deberse a tres factores: (1) la proteína blanco, (2) el ARNm blanco y (3) la naturaleza intrínseca del PNA. En primer lugar, la vida media de las proteínas puede no ser la misma. Esto podría ser el caso de EhS α , tal vez el recambio de ésta es más lento (mucho mayor a 96 h), que por ejemplo el de Se61, lo cual enmascara una inhibición sobre la traducción de la proteína y por tanto un posible efecto a nivel de proliferación. Segundo, la estabilidad, estructuración y cantidad de los ARNm blancos puede diferir de uno a otro. La estructuración de cada ARNm puede dejar secuencias más o menos expuestas para la nucleación con el PNA, con una diferencia tan dramática como tener o no tener efecto. Esto tiene como sustento lo observado en ensayos de inhibición de la proteína Rab8 realizados previamente en el laboratorio y lo reportado por otros grupos (Tesis de maestría de Andrés Saralegui, 2002; Doyle, 2001). PNAs dirigidos contra los primeros 17 nucleótidos de la región codificante del ARNm de Rab8, disminuyen en un 80 % el nivel de la proteína con respecto al control, sin embargo, cuando el PNA se dirige contra la región 5' no traducida del ARNm (esto es 11 nucleótidos corriente arriba), la inhibición de la traducción desaparece. Por último, no se puede descartar la posibilidad de que diferentes PNAs (con respecto a secuencia/composición), interactúen de manera diversa con el contenido citosólico, exponiéndose en mayor

o menor medida a un secuestro de cualquier tipo, o que formen estructuras inter- o intramoleculares que impidan su hibridación con la secuencia blanco.

Figura 19. Inhibición de la proliferación en trofozoítos tratados con PNAs contra EhS2. Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos se incubaron 96 h con 20 μ M del PNAs sin modificar.

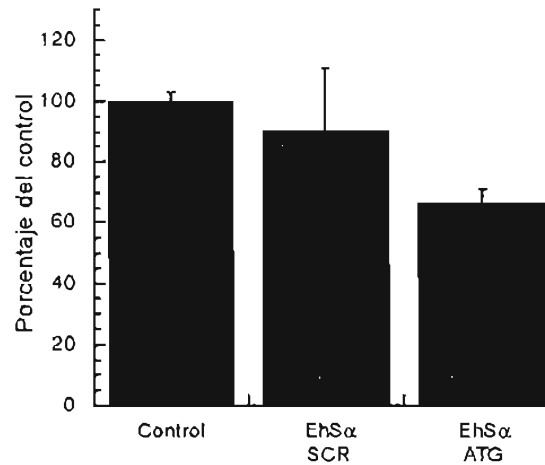
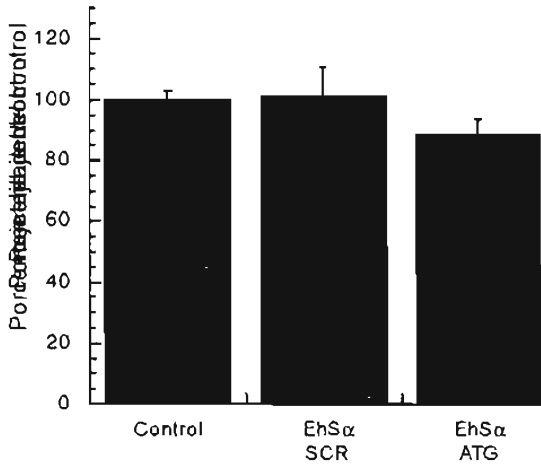
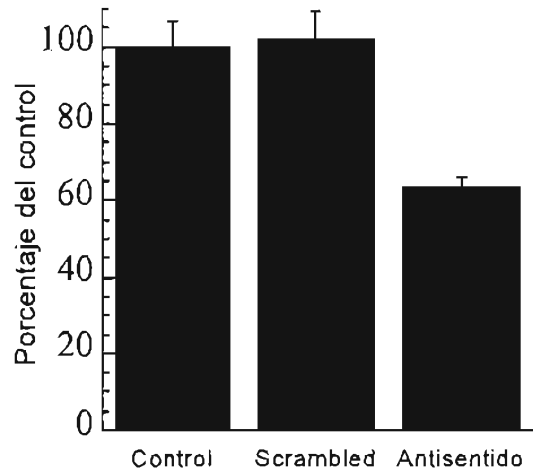


Figura 20. Inhibición de la proliferación y expresión de EhS α en trofozoítos tratados con PNAs. Izquierda, proliferación; Derecha, niveles de la proteína blanco. Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos se incubaron 96 h con 20 μ M de los PNAs sin modificar.

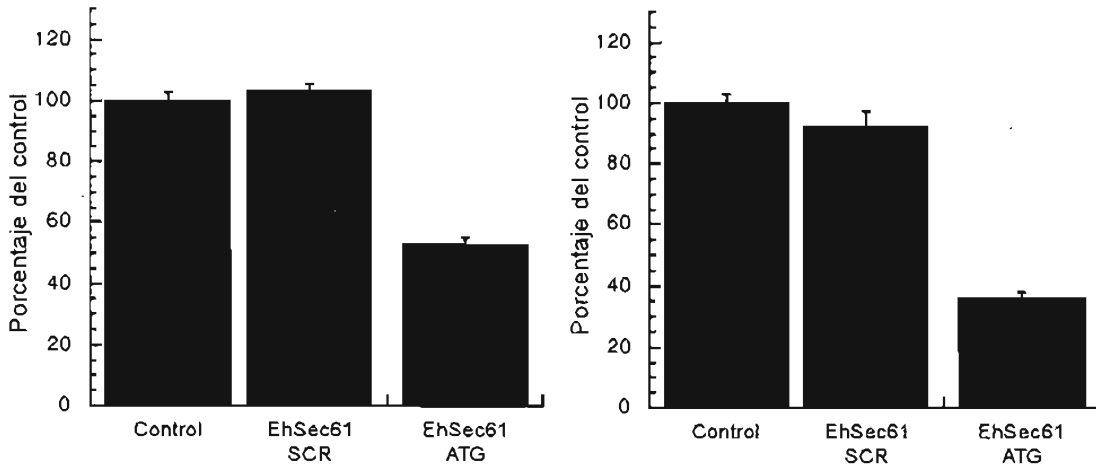
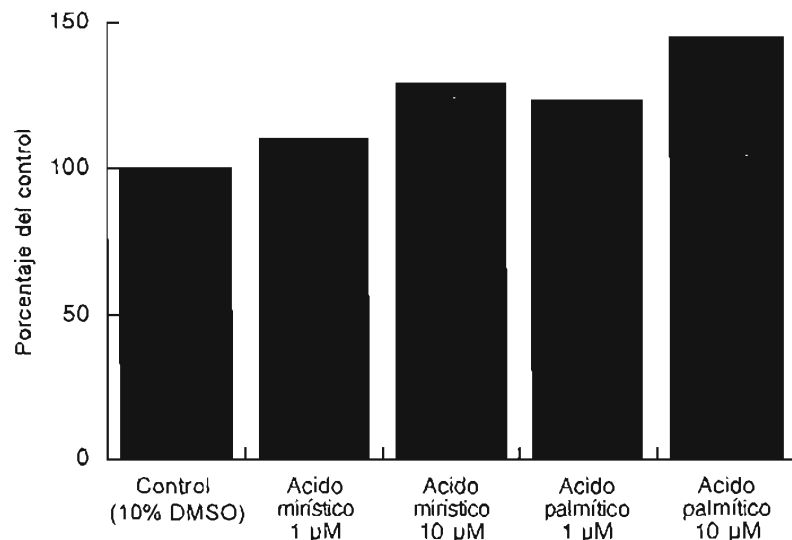


Figura 21. Inhibición de la proliferación y expresión de EhSec61 en trofozoítos tratados con PNAs sin modificar. Izquierda, niveles de la proliferación; Derecha, niveles de la proteína blanco. Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos se incubaron 96 h con 20 μM de los PNAs sin modificar.

Ensayos con PNAs modificados. Como se mencionó anteriormente, una alternativa para incrementar la permeabilidad de los PNAs (y consecuentemente disminuir las dosis de trabajo), fue derivatizarlos con el ácido graso mirístico. Como se determinó que los conjugados K-B-PNA-miristato presentaron una mayor permeabilidad a los trofozoítos (Figura 16), se decidió bajar la dosis de trabajo para los estudios de inhibición de la expresión génica.

Primeramente, se realizaron como control, ensayos de proliferación incubando a los trofozoítos con 1 y 10 μM de los ácidos grasos mirístico y palmítico. Como se muestra en la figura 22, ninguno de los dos ácidos grasos afectó la proliferación de trofozoítos en cultivo a las concentraciones utilizadas (Figura 22).

Figura 22. Proliferación de trofozoítos tratados con 1 y 10 μM de los ácidos mirístico y palmítico. Los ácidos se disolvieron en agua con 10 % DMSO, el control se incubó con agua 10 % DMSO.



Posteriormente, cultivos de trofozoítos en fase exponencial se incubaron por separado 96 h con y sin 1 μM de los conjugados B-K-PNA-miristato antisentido y *scrambled* contra los ARNm de EhSec61 y EhS α . Para verificar que las modificaciones en el C-terminal no interferían con la hibridación del PNA, se incluyó como control el conjugado B-K-PNA a 20 μM .

Como se muestra en la figura 23, la inhibición de la expresión de la proteína blanco con el conjugado B-K-PNA, fue la misma que se observó con el PNA sin modificaciones, indicando que esta modificación no interfiere con la funcionalidad del PNA.

Los PNAs derivatizados con miristato a 1 μM no inhibieron la expresión de la proteína de ambos genes, aún cuando en teoría hay una cantidad equiparable a 100 μM del PNA no modificado (resultados de permeabilidad) (Figura 23).

Ya que el conjugado B-K-PNA retuvo su capacidad inhibitoria, la pérdida de función de los conjugados con miristato es, probablemente, debido a que el PNA pierde la propiedad de hibridar con su ARNm blanco al ser modificado en ambos extremos. También, podría ser que el N-terminal es esencial para la nucleación del PNA con su ARNm blanco, aunque se ha descrito que algunos PNAs modificados en el N-terminal no pierden su función (Good, 2001). Cabe destacar que esta pérdida de función no parece ser secuencia/composición dependiente, ya que en ambos casos (contra Eh α S y EhSec61) no se afectó la expresión de la proteína correspondiente. No se realizaron experimentos a dosis mayores con los conjugados B-K-PNA-miristato, ya que es irrelevante la utilización de éstos a concentraciones similares a la de los PNAs no modificados.

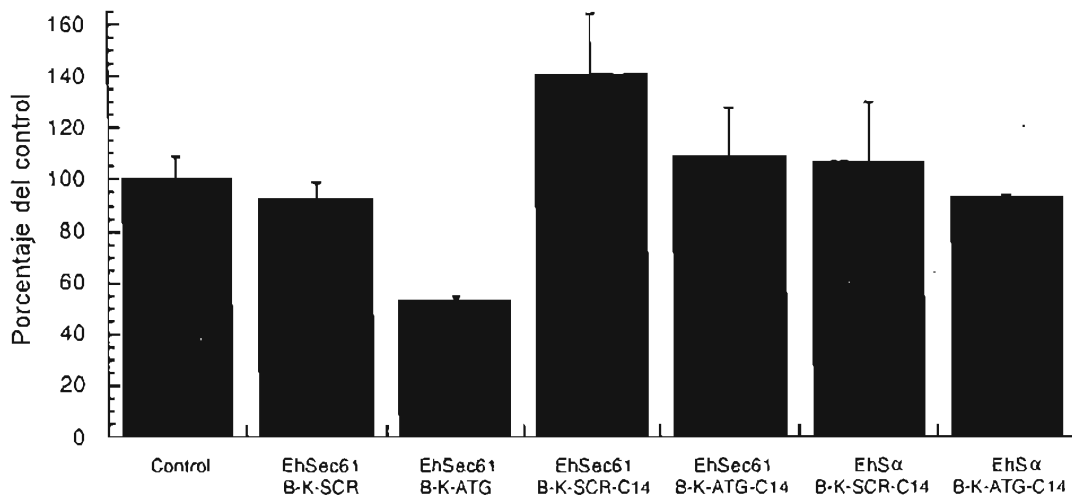


Figura 23. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados. Biotina (B), lisina (K), y en su caso con miristato (C14). Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos, se incubaron 96 h con 20 μM de los B-K-PNAs y 1 μM de los B-K-PNA-C14.

Para comprobar si la derivatización en ambos extremos era determinante para la nucleación del PNA con su secuencia blanco, sintetizamos conjugados solamente con el grupo miristato en el N-terminal (PNA-miristato). Se generaron dos conjugados de PNA, uno unido directamente al miristato (PNA-miristato) y otro utilizando una lisina como espaciador (PNA-K-miristato). Este segundo fue con el objetivo de determinar la relevancia de la distancia entre el miristato y el PNA en términos de funcionalidad.

En la figura 24 se muestra el promedio de muestras por duplicado, de los niveles de la proteína EhSec61 de trofozoítos incubados 72 ó 96 horas con diferentes concentraciones del conjugado PNA-K-miristato antisentido o su *scrambled*. Aquí se observó que tanto el PNA antisentido como el *scrambled* presentaron una misma disminución de la proteína blanco y que este efecto es inespecífico, ya que no depende de secuencia, es dosis dependiente. El conjugado PNA-miristato (sin lisina) mostró el mismo comportamiento.

De este experimento cabe destacar tres puntos. Primero, el espaciador entre el PNA y el grupo miristato no representa una diferencia, ya que ambos se comportaron de la misma manera. Segundo, el efecto inespecífico que se observó, es dosis dependiente. Tercero, el conjugado ideal sería aquel que una vez dentro de la célula, sea capaz de perder el grupo miristato. Este último punto nos llevó a la siguiente serie de síntesis.

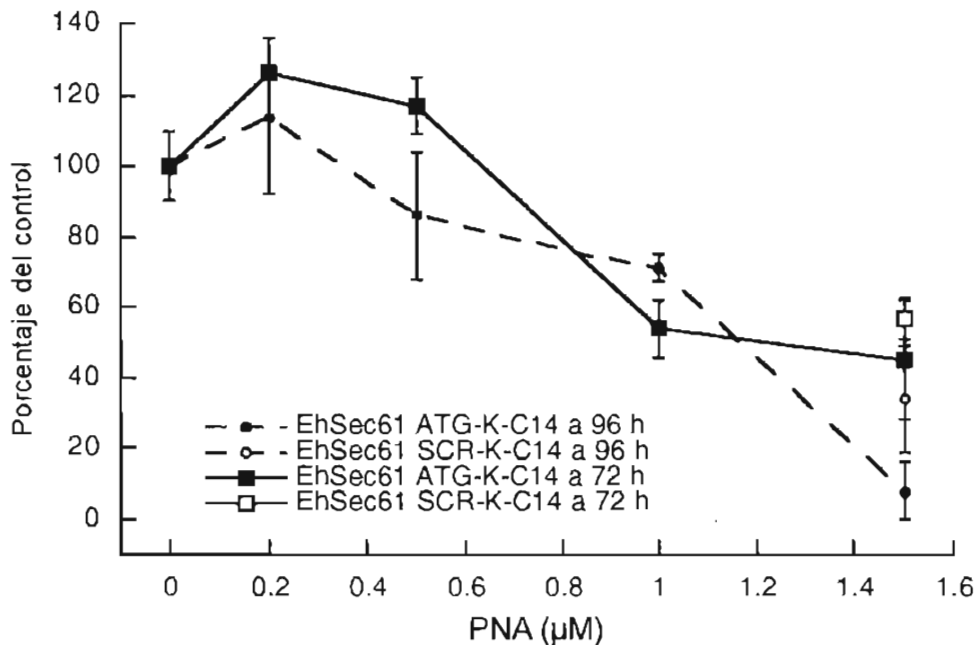


Figura 24. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal. Con lisina (K) y miristato (C14). Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos, se incubaron 96 h con diferentes concentraciones de los PNA-K-C14.

Ya que se determinó que la unión covalente del miristato interfiere con la función específica del PNA, decidimos acoplar el grupo miristato a éste de una manera distinta. La consideración más importante para decidir qué tipo de conjugación deseábamos, fue que el grupo miristato debía separarse del PNA postinternalización.

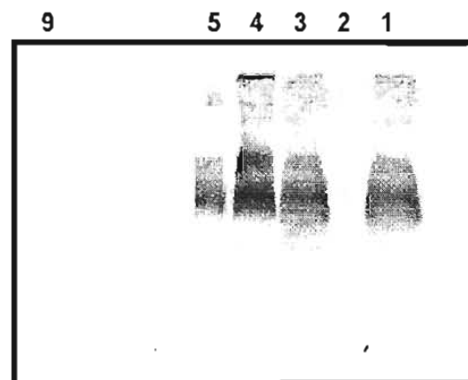
Previamente, se demostró que conjugados de PNA con péptidos penetrantes, vía puente disulfuro (por cisteínas), se reducen rápidamente en el citosol de células mielómicas Bowes (Pooga M, 1998). Por otro lado, se sabe que protozoarios anaeróbicos aerotolerantes, como en el caso de *Entamoeba*, presentan un citosol altamente reductor (McLaughlin J, 1985).

Primeramente, antes de llevar a cabo la síntesis de un conjugado reducible, se determinó el potencial reductor del medio condicionado con trofozoítos. Se incubaron 10,000 trofozoítos por 2 h, se centrifugaron y el medio de cultivo se separó. Se utilizó como sustrato un conjugado reducible BSA-péptido, el cual se incubó por 2 h a 37 °C con el medio condicionado. La reducción del puente disulfuro del conjugado BSA-péptido, se analizó por Western blot, utilizando anticuerpos anti-péptido. Una pérdida de señal en el Western blot, significa una reducción del puente disulfuro, ya que el péptido solo migra con el frente (Figura 25, carril 9). Como se puede observar en la misma figura, en los carriles 1 y 3, el puente disulfuro no fue reducido por el medio condicionado en las condiciones utilizadas. Este experimento se realizó a 2 h de incubación, ya que los estudios de permeabilidad mostraron que el conjugado PNA-miristato se localizó dentro de las células a este tiempo (figura 16). Con estos datos concluimos que si lográbamos generar un conjugado lipofílico reducible, éste sólo se reduciría dentro de las células y no fuera.

Con base en estos resultados, sintetizamos el conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato. La reducción de este conjugado liberaría por un lado el PNA-cisteína y por otro lado el complejo cisteína-1,2-diaminoetano-miristato. Reportes previos determinaron que PNAs modificados con una cisteína en el amino terminal, retienen su capacidad de hibridar con su ARN blanco y por ende su actividad inhibitoria. Como control se sintetizó un conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano sin miristato.

Primero, se realizó un estudio comparativo del PNA sin modificaciones y el PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano reducido y sin reducir. Como se muestra en la figura 26, no hay ninguna diferencia significativa en los niveles de inhibición de la proteína blanco. Con esto se ratificó el hecho de que una cisteína en el amino terminal no interfiere con la actividad del PNA.

Figura 25. Capacidad reductora del medio condicionado de amibas. Medio condicionado por 2 h con 10,000 amibas. 1) sobrenadante, 2) Vacío, 3) sobrenadante, 4) amibas, 5) control sin reducir y 9) control reducido.



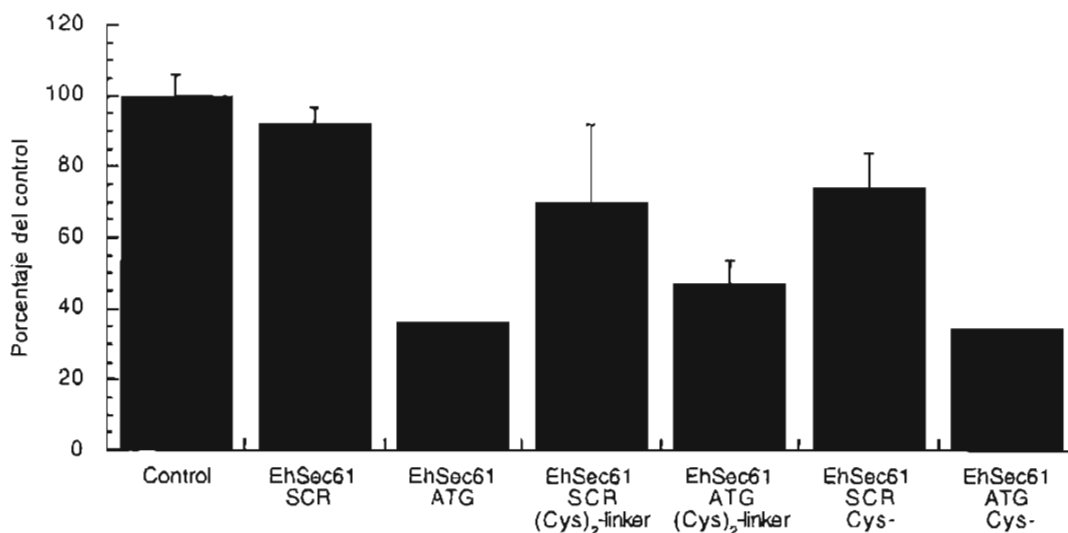


Figura 26. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs, reducidos y sin reducir. Modificados en el N-terminal con cistina (Cys₂) y 1,2-diaminoetano (linker). Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos se incubaron 96 h con 20 μ M de los PNAs.

A continuación, se realizó un estudio a diferentes concentraciones de la actividad inhibitoria del conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato. Como se muestra en la figura 27, contrario a lo que se esperaba, el conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato no presentó un incremento en la actividad inhibitoria en comparación al PNA sin modificaciones.

Hay varias interpretaciones posibles para este resultado. Primero, el PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato es altamente internalizado, pero el puente disulfuro no se reduce en el citoplasma, consecuentemente pierde su capacidad de hibridación. Segundo, el puente disulfuro se reduce fuera de la célula, por lo que el conjugado pierde la alta permeabilidad y se comporta como el PNA sin modificaciones. Tercero, el grupo Cys-Cys-1,2-diaminoetano, neutraliza la contribución hidrofóbica del miristato, en tal caso la alta permeabilidad se pierde. De manera indirecta, proponemos que esto último fue lo que sucedió. Al purificar los conjugados por HPLC, el porcentaje de acetonitrilo requerido para eluir el conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato (18%), fue el mismo que el del PNA sin modificaciones (15%), a diferencia de los conjugados PNA-miristato y PNA-K-miristato, los cuales eluyeron con 65% acetonitrilo. De manera general, el porcentaje de acetonitrilo que se requiere para el despegado de un analito de la fase sólida de la columna (Fase reversa, C₁₈), es un indicativo de la hidrofobicidad de éste, a mayor porcentaje de acetonitrilo mayor hidrofobicidad. Entonces, al presentar el mismo patrón de elución el conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato y el PNA sin modificar, se puede suponer que la hidrofobicidad media de estas dos moléculas es similar. Por tanto, si el incremento

de la hidrofobicidad era la causa del aumento de la permeabilidad, el conjugado PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato perdió su permeabilidad y se comportó de la misma manera que el PNA sin modificaciones.

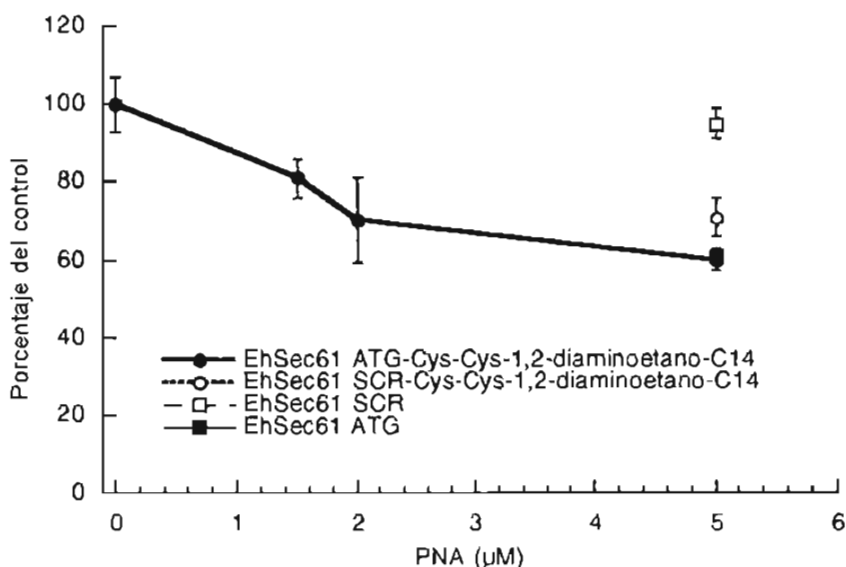


Figura 27. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal con cistina (Cys₂), 1,2-diaminoetano (linker) y miristato (C14). Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos, se incubaron 96 h con diferentes concentraciones de los PNAs.

Como última alternativa, se sintetizaron otros dos conjugados, PNA-hexanoato y PNA-decanoato. Estos conjugados se sintetizaron con el propósito de determinar la reelevancia de la longitud de la cadena saturada del ácido graso, en términos de permeabilidad e inhibición específica. Tal vez, al disminuir la longitud de la cadena saturada, los conjugados retienen su alta permeabilidad e inhiben de manera específica la traducción de la proteína blanco.

Como se muestra en la figura 28, tanto el conjugado PNA-hexanoato como el conjugado PNA-decanoato, a 1 μM, no inhibieron la expresión de la proteína EhSec61. Cabe destacar, que para estos conjugados no se determinó la permeabilidad, lo cual impide concluir si la falta de efecto es debido a una baja permeabilidad o a una pérdida de función (capacidad de nucleación).

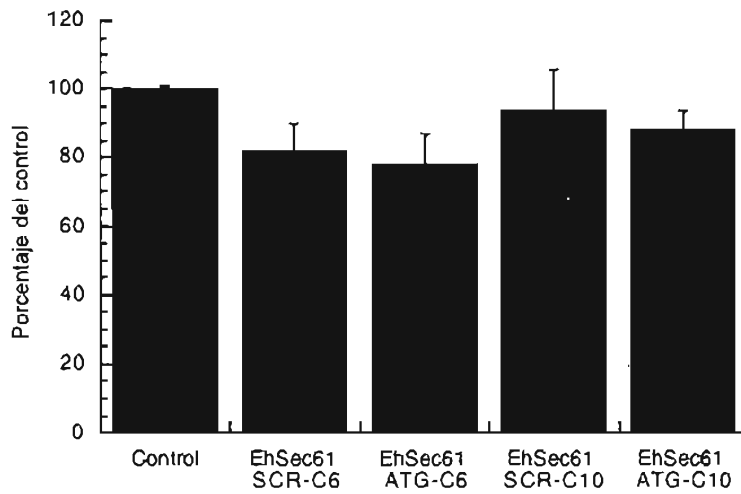


Figura 28. Inhibición de la expresión génica en trofozoítos tratados con PNAs modificados en el N-terminal con hexanoato y decanoato. Cultivos en crecimiento exponencial de trofozoítos, se incubaron 96 h con 1 μ M de los PNAs.

Ensayos de inhibición de la traducción *in vitro* con PNA.

Para determinar si la inhibición inespecífica que se observó en los ensayos celulares con los complejos PNA-miristato operó directamente sobre la maquinaria de traducción, se realizaron experimentos de traducción *in vitro* utilizando el ARNm de luciferasa (un ARNm irrelevante). Previo a la traducción se preincubó por 30 min a 37 °C 1 µg de ARNm de luciferasa con: a) 1 µM de PNA antisentido sin modificaciones, b) 1 µM de PNA-K-miristato antisentido y c) 1 µM de PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato antisentido.

Una fracción de las muestras de traducción se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 25 % y se determinó la incorporación de Met [³⁵S]. Como se muestra en la figura 29, la incorporación de metionina marcada fue la misma en todos los casos, indicando que los PNAs no presentan un efecto directo sobre la maquinaria de traducción (de conejo) con este ARN. Para corroborar estos resultados, se realizó una autorradiografía digital a partir de un gel SDS-PAGE al 12.5 %, en el cual la banda mayoritaria (luciferasa) fue cuantificada por densitometría (Figura 30). La densitometría mostró que la cantidad de proteína en todas las muestras fue igual, correlacionando positivamente con las mediciones de incorporación de metionina (Figura 31).

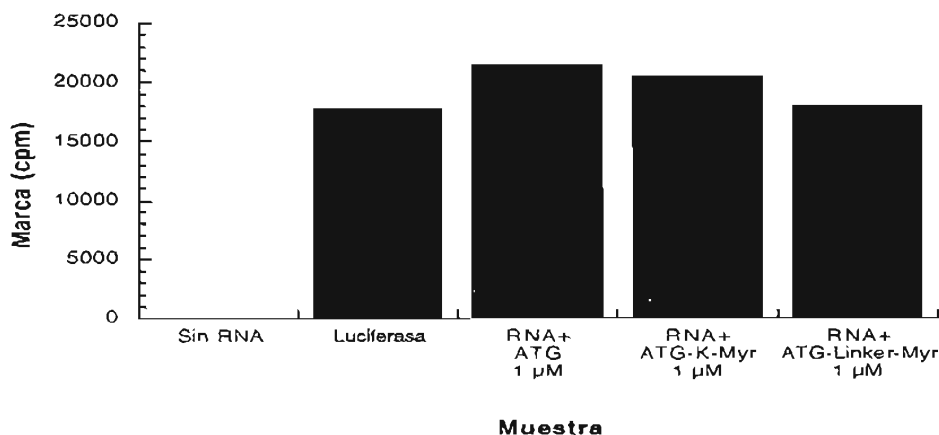


Figura 29. Incorporación de Met [³⁵S]. Traducción *in vitro* de 1 µg de ARN de luciferasa con y sin PNA.

Figura 30. Traducción *In vitro* del ARNm de luciferasa. 2) MPM; 3) ARN sin PNA; 4) ARN más PNA sin modificaciones; 5) ARN más PNA-K-miristato; 6) ARN más PNA-cistina-1,2-diaminoetano-miristato; 7) ARN sin PNA; 8) Vacío; y 9) ARN sin PNA. Gel al 12.5 %. El gel se reveló por 5 días.

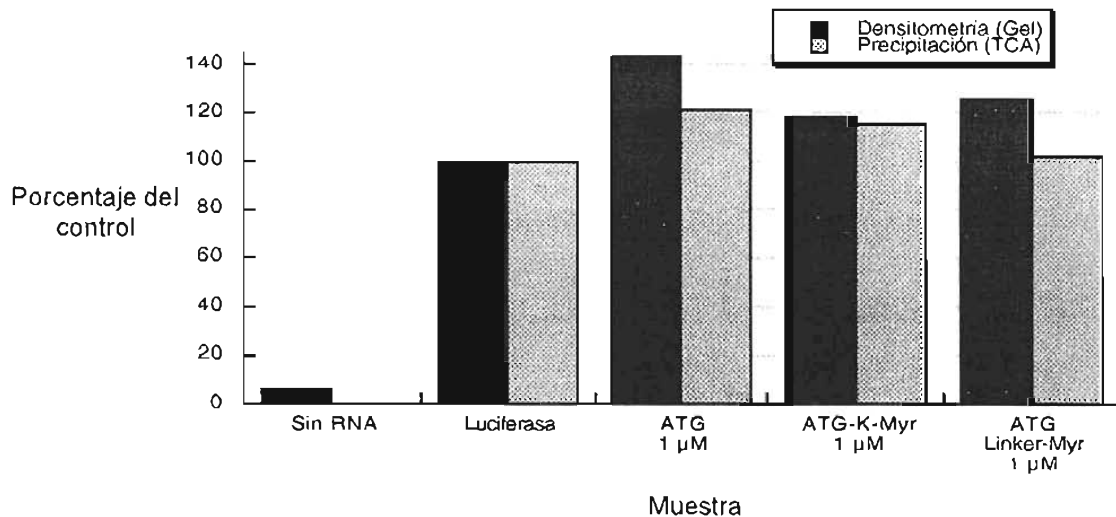
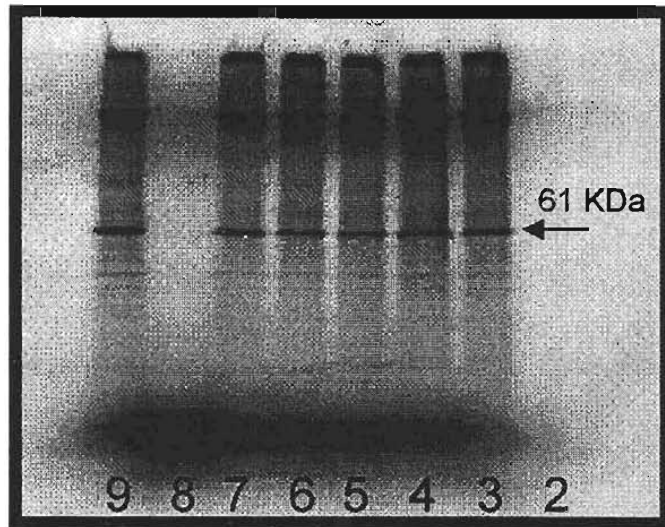


Figura 31. Correlación entre la densitometría (gel) y la precipitación con TCA de la traducción *in vitro* del ARNm de luciferasa.

Una vez que se determinó que los PNA antisentido no interferían con la traducción de un ARN irrelevante, se decidió realizar el mismo estudio pero utilizando ARN poli (A) total de ameba (Figura 32). De igual manera que en el estudio anterior, la incorporación de metionina no mostró ninguna diferencia significativa entre las muestras con y sin PNA (Figura 33). Aunque en este *pool* de ARN se encuentra el ARNm de EhSec61, era poco probable observar una

diferencia en la cantidad de incorporación, ya que la abundancia del ARNm de EhSec61 se estima en no más del 1 %, cantidad que no se puede discriminar con esta técnica. Al realizar un gel SDS-PAGE con estas muestras, se observó que la intensidad de las bandas más abundantes (por ejemplo actina, que es el 30 % de la proteína total) de las diferentes muestras no varió significativamente (Figura 34). Estos resultados sugieren que la inhibición inespecífica de los PNAs modificados con el grupo miristato no se debe a una acción directa sobre la maquinaria de traducción.

Figura 32. Purificación de ARN poli (A) total de amiba.
1) MPM; 2) 1.9 µg de ARN poli (A) total de amiba.

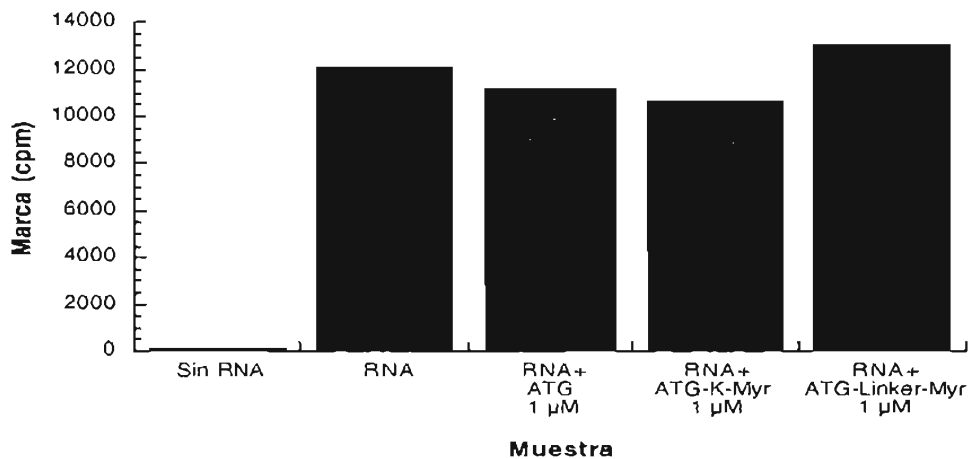
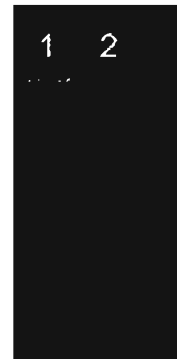


Figura 33. Incorporación de Met³⁵S. Traducción *in vitro* de 2 µg de ARN poli (A) total de amiba.

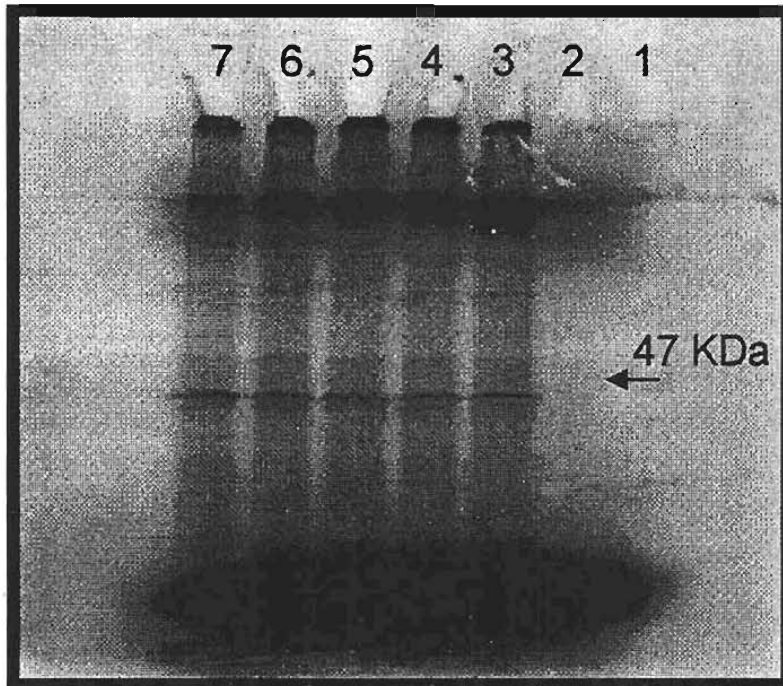


Figura 34. Traducción *in vitro* de ARNm total de ameba. 1) MPM; 2) Sin ARN; 3) Control; 4) PNA sin modificaciones; 5) PNA-K-Myr; 6) PNA-Linker-Myr; y 7) Control. Gel al 10 %.

Ya que no se observó un efecto inespecífico de los conjugados PNA-miristato resultado de una inhibición genérica sobre la maquinaria de traducción, se evaluó su capacidad inhibitoria directamente sobre el ARN de EhSec61 en el sistema *in vitro*.

Para esto, se transcribió *in vitro* el gen completo de EhSec61 (región codificante). Para dicho efecto se utilizaron como molde tres distintas construcciones: pBSSK-EhSec61, pCITE4a-EhSec61 y pCITE4c-EhSec61 (Figura 35). Una vez transcrito el ARN (Figura 36), y previo a la traducción, éste se preincubó por 30 min a 37 °C con: a) 1 μ M de PNA antisentido sin modificaciones, b) 1 μ M de PNA-K-miristato antisentido y c) 1 μ M de PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato antisentido. La traducción se realizó utilizando dos distintas marcas comerciales de lisados de reticulocitos de conejo. En ninguno de los casos, con las muestras de ARN de EhSec61, se observó proteína, ya sea por incorporación de Met [35 S], autoradiografía o Western blot. Esta falta de traducción puede deberse a que la transcripción de la región codificante no sea suficiente para la traducción *in vitro*, aún a partir de sistemas como el pCITE, que agregan una serie de señales consenso (*Cap Independent Translation Enhancer*) para optimizar los niveles de traducción *in vitro*. Cabe destacar, que al momento no se ha reportado la traducción *in vitro* de ningún gen de ameba transcrito *in vitro*.

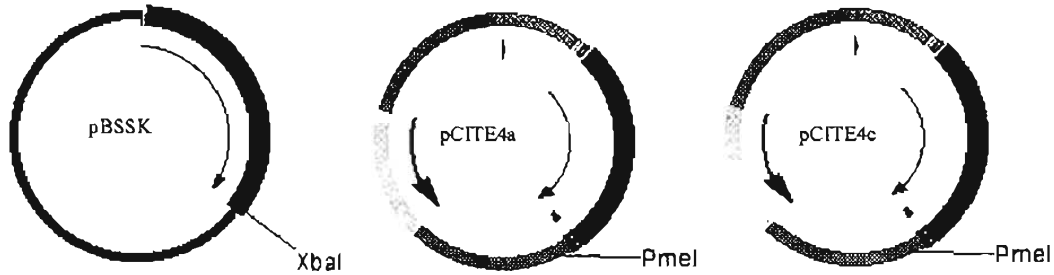


Figura 35. Vectores de transcripción *in vitro* de EhSec61.

Figura 36. ARN de Sec61 transcrito *in vitro*. 1) MPM; 2) 712 ng de ARN de Sec 61; y 3) 900 ng de ARN de luciferasa.



Como última alternativa, y debido a que el ARN producido por transcripción *in vitro* no se tradujo, se decidió purificar el ARNm de EhSec61 a partir del ARN poli (A) total de amiba, como se había reportado para el ARNm de actina, mediante captura por hibridación. Esta aproximación no fue posible, ya que el material purificado resultante no fue suficiente para los ensayos de traducción *in vitro*.

Ensayos de cinética y estabilidad de híbridos PNA/ADN.

Como una manera indirecta de evaluar los posibles mecanismos de interacción de los PNAs con sus secuencias blanco, se decidió determinar la cinética y estabilidad de los híbridos PNA/ADN, tanto para los PNA no modificados (capaces de inhibir la traducción de manera secuencia-dependiente), como para los modificados (cuyos espectros de inhibición son inespecíficos con respecto a secuencia).

Determinación de las T_m (estabilidad de híbridos). Las T_m de todos los conjugados se obtuvieron utilizando como secuencia blanco un oligonucleótido 17mero de ADN complementario al PNA antisentido. La T_m se determinó utilizando el programa GraphPad Prism (versión 2) como se ejemplifica en la figura 37.

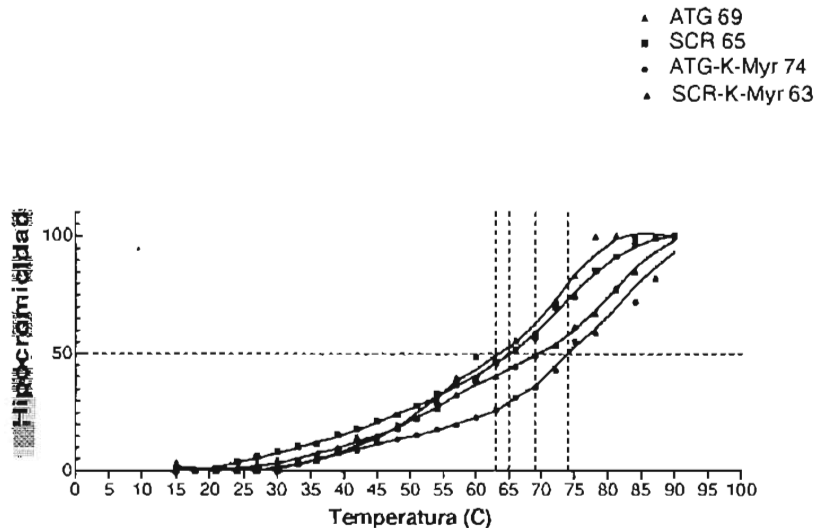


Figura 37. Determinación de la T_m de los complejos PNA/ADN. Ejemplificación del procesamiento de los datos de las curvas de hipocromicidad utilizando un ajuste de curva sigmoide.

En la tabla 4 se muestran las T_m obtenidas para todos los conjugados. Como se puede observar en esta tabla, la estabilidad de los híbridos PNA/ADN (en solución) de los PNAs modificados con ácidos grasos no depende estrictamente de la secuencia del PNA, ya que hay PNAs *scrambled* con una mayor T_m que su antisentido correspondiente. Como ejemplo, en los conjugados directos PNA-ácido graso (PNA-C6, PNA-C10 y PNA-C14) la longitud de la cadena hidrocarbonada es directamente proporcional a la estabilidad inespecífica

(no dependiente de secuencia) del híbrido. Esto no fue el caso de los PNAs sin modificaciones hidrofóbicas, en los cuales siempre se observó una mayor T_m para los antisentido. Esto podría explicar las inhibiciones inespecíficas que se observaron con los conjugados PNA-ácido graso en los ensayos con amibas en cultivo.

Tabla 4. T_m obtenidas de los híbridos PNA/ADN.

PNA	T_m (C)
ATG	69
SCR	65
ATG-K-Myr	74
SCR-K-Myr	63
ATG-Linker-Myr	79.5
SCR-Linker-Myr	67.5
ATG-Linker	73.5
SCR-Linker	66
ATG-C6	70
SCR-C6	61
ATG-C10	69.5
SCR-C10	69.5
ATG-C14	72
SCR-C14	75
B-K-ATG	69
B-K-SCR	57
B-K-ATG-Myr	71
B-K-SCR-Myr	69.5

Al graficar los resultados de las T_m y los porcentajes de inhibición de los niveles de proteína de los PNAs sin modificar (con ácidos grasos), se obtiene una correlación de 0.81, la cual tiene un valor predictivo de la funcionalidad del PNA con respecto a su T_m (Figura 38). Cuando se hace el mismo ejercicio con los PNAs modificados directamente e indirectamente con ácidos grasos, este análisis pierde su valor predictivo, ya que la correlación es tan solo de 0.132 (Figura 39).

Figura 38. Correlación entre la estabilidad del híbrido (T_m) y porcentaje de inhibición de PNAs no derivatizados con ácidos grasos.

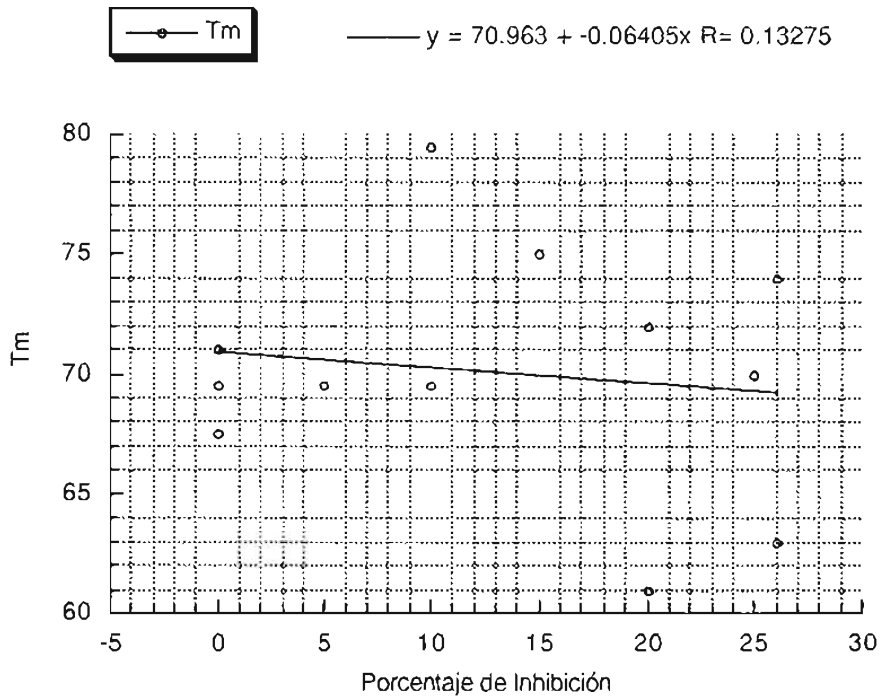
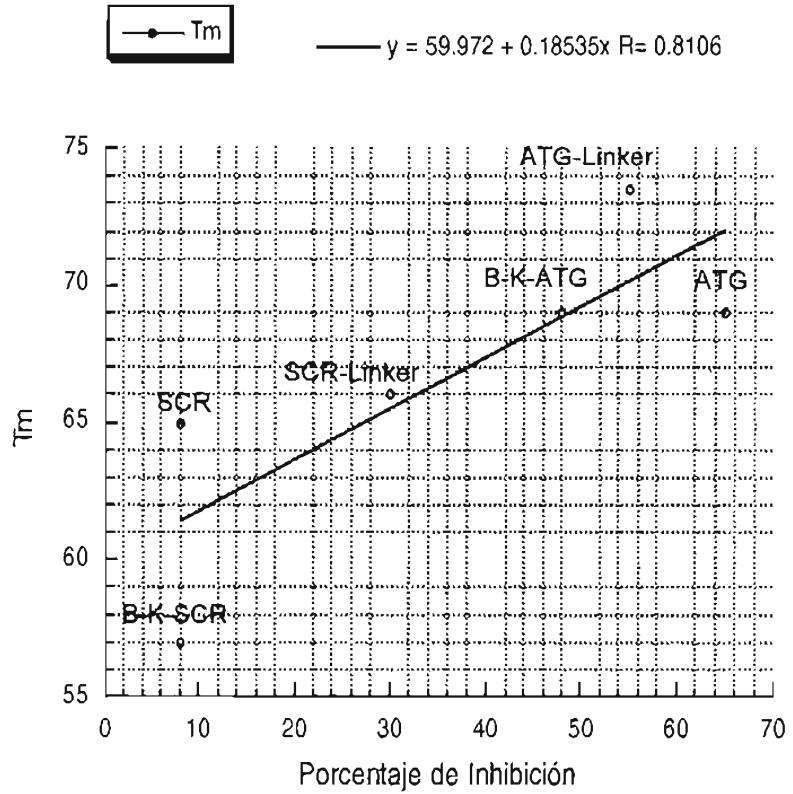


Figura 39. Correlación entre la estabilidad del híbrido (T_m) y porcentaje de inhibición de conjugados de PNA con ácidos grasos.

Ensayos de Biacore (cinética de formación de híbridos). La técnica del Biacore permite estudiar, en tiempo real, la interacción en fase sólida de un ligando con su analito. Se generó una construcción plasmídica que contenía los primeros 250 nucleótidos del gene EhSec 61 (Figura 40). Esta secuencia se transcribió *in vitro* utilizando una mezcla de ribonucleótidos-UTP-Biotina (Roche). El transcrito generado se acopló por medio de la biotina a un *chip* (SA), el cual está recubierto de estreptavidina. Una vez que se eliminó todo el ARN que no se acopló, se prosiguió a estudiar la interacción de los diferentes PNAs con el transcrito inmovilizado. Cabe mencionar que el *chip* presenta dos celdas, una de las cuales no se modificó y la cual se utilizó como referencia, lo que permitió evaluar el pegado inespecífico del PNA a la superficie de estreptavidina. Esta respuesta se resta a la obtenida en la celda-muestra (con ARN) resultando en un *sensograma* corregido (Figura 41). En la tabla 5 se muestran la KD obtenidas para cada conjugado.

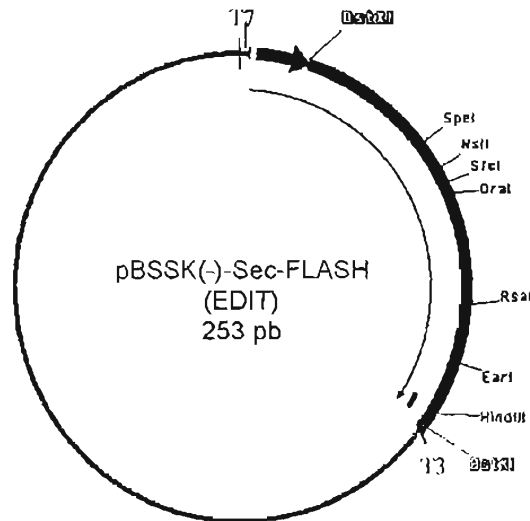


Figura 40. Vector de transcripción para la producción de ARN para los ensayos de Biacore. El plásmido se digirió con la enzima *Bstx I*.

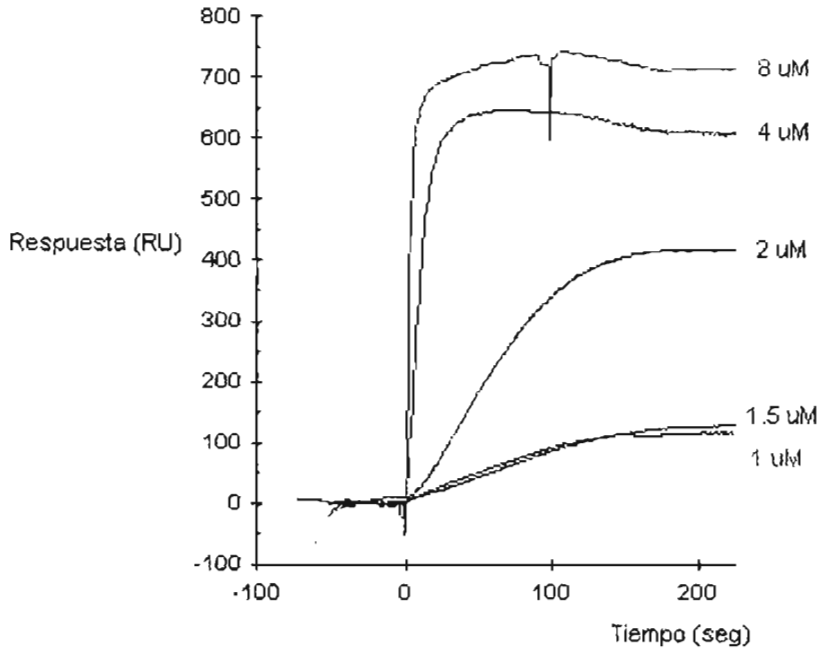


Figura 41. Gráfica representativa de los *sensogramas* corregidos de la cinética de hibridación de PNA/ADN.

Tabla 5. KD obtenidas de los híbridos PNA/ADN.

PNA	T _m (C)	KD	T _m (K)	1/T _m
ATG	69	2.21 10 ⁻⁷	342	0.00292398
SCR	65	2.94 10 ⁻⁷	338	0.00295858
ATG-K-Myr	74	.005 10 ⁻⁷	347	0.00288184
SCR-K-Myr	63	21.4 10 ⁻⁷	336	0.00297619
ATG-Linker-Myr	79.5	7.33 10 ⁻⁸	352.5	0.00283688
SCR-Linker-Myr	67.5	6.93 10 ⁻⁵	340.5	0.00293686
ATG-Linker	73.5	2.61 10 ⁻⁹	346.5	0.002886
SCR-Linker	66	6.82 10 ⁻⁸	339	0.00294985
ATG-C6	70	4.85 10 ⁻⁷	343	0.00291545
SCR-C6	61	5.56 10 ⁻⁶	334	0.00299401
ATG-C10	69.5	3.7 10 ⁻⁷	342.5	0.00291971
SCR-C10	69.5	6.39 10 ⁻⁷	342.5	0.00291971
ATG-C14	72	2.99 10 ⁻⁹	345	0.00289855
SCR-C14	75	9.37 10 ⁻⁹	348	0.00287356
B-K-ATG	69	ND	342	0.00292398
B-K-SCR	57	ND	330	0.0030303
B-K-ATG-Myr	71	ND	344	0.00290698
B-K-SCR-Myr	69.5	ND	342.5	0.00291971

Para complementar los datos de las T_m (estabilidad en solución) se realizó una gráfica de las T_m contra las KD obtenidas (hibridación en fase sólida) (Figura 42). Al graficar todos los datos, se determinó una correlación de 0.178. Al eliminar los datos de los conjugados PNA-Cys-Cys-1,2-diaminoetano-miristato (antisentido como scrambled) la correlación aumentó hasta 0.73 (Figura 43).

Figura 42. Correlación entre la cinética de hibridación (KD) y estabilidad del híbrido (Tm).

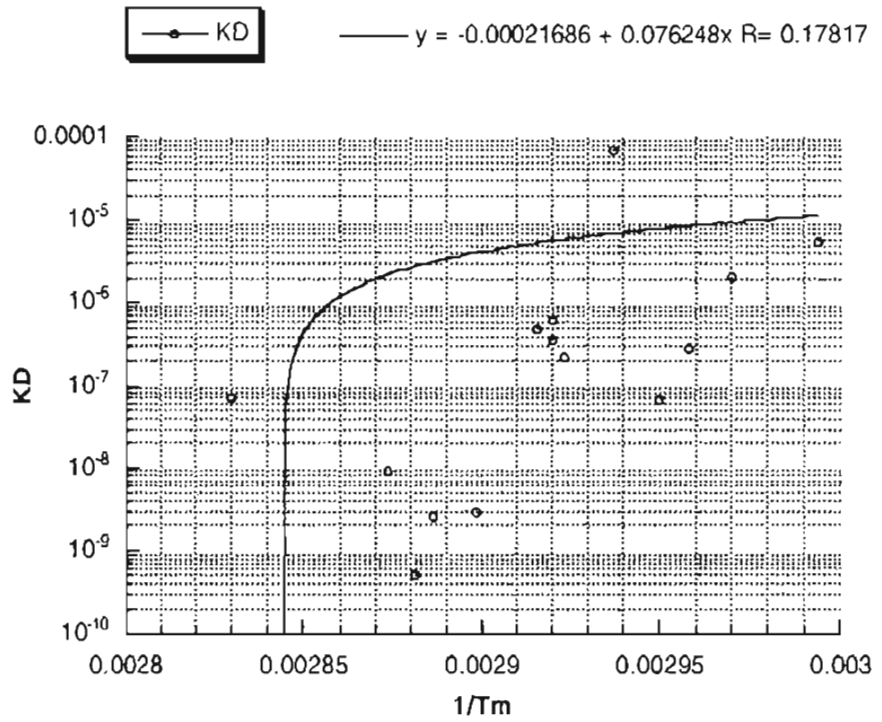
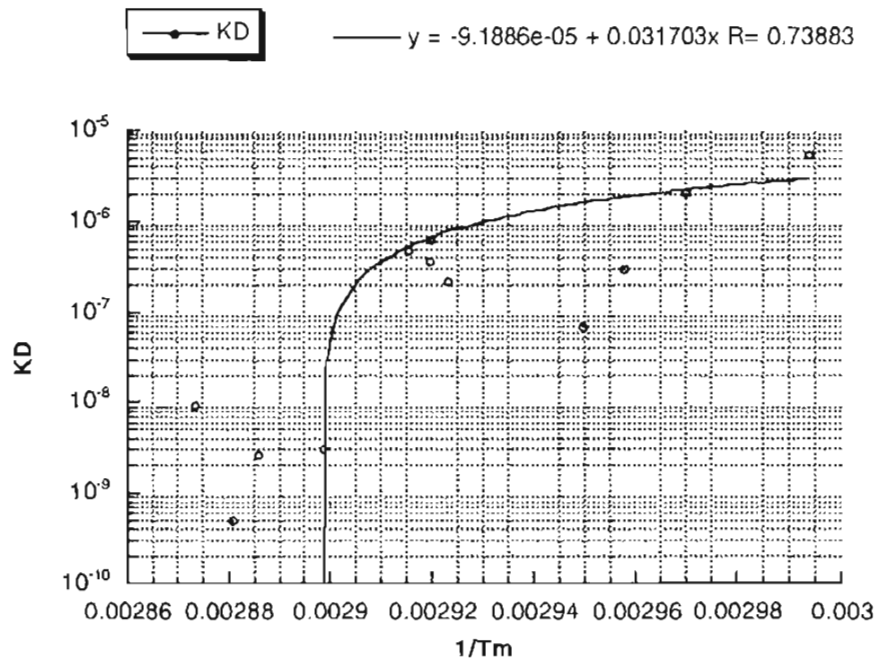


Figura 43. Correlación entre la cinética de hibridación (KD) y estabilidad del híbrido (Tm). Se excluyeron los datos de los conjugados antisentido y scrambled PNA-cistina-1,2-diaminoetano-miristato.



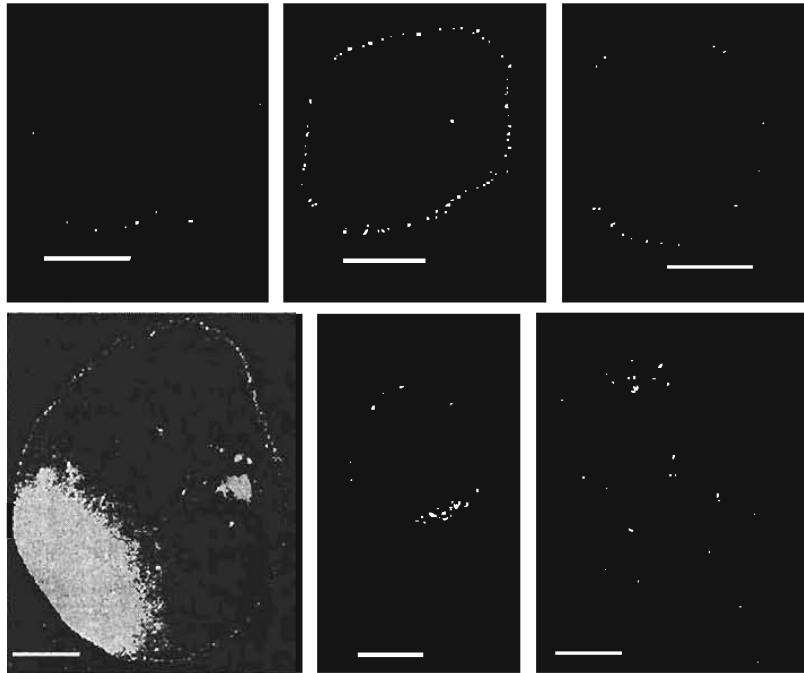
Ensayos de la localización de factores de virulencia Amibaporo y Cisteína proteasa 5 en trofozoítos.

Una consecuencia frecuente de la infección con *E. histolytica* es la producción de ulceraciones y destrucción de tejido del huésped, que ocurre esencialmente a nivel del epitelio del colon e hígado. Se ha propuesto, que estas patologías son el resultado de interacciones entre factores de virulencia del parásito y factores del huésped. Algunos de estos factores de virulencia propuesto son: péptidos formadores de poros, amibaporo (Leippe, 1997); la lectina Galactosa-N-acetilgalactosamina (Petri, 2002); y la familia de proteasas de cisteína (Que, 1997). Ya que estos factores se localizan en la membrana plasmática, son secretados y/o modificados post-traduccionalmente, podría suponerse que el procesamiento y tráfico de proteínas debe de estar asociado al proceso de invasión de este parásito. Con el propósito de determinar si esta asociación (si es que la hay) es a través de la secreción de factores de virulencia, se analizó la distribución de amibaporo y proteasa de cisteína 5 (CP5) a nivel de membrana plasmática en trofozoítos tratados con el PNA contra la proteína Sec61. Cabe recordar que esta proteína está involucrada en la parte inicial de la vía secretoria y la cual se disminuye entre un 65-80% en trofozoítos tratados con PNA contra ésta.

Trofozoítos en fase exponencial se incubaron por separado 96 h con y sin 20 μ M de los PNAs sin modificar antisentido y *scrambled*. Al término de esta incubación, se analizó la distribución de amibaporo y CP5 por microscopía confocal. El análisis se realizó con células no permeabilizadas, ya que gran parte de la señal se pierde al permeabilizar con Triton X-100. Como se muestra en la figura 44, no se afectó significativamente la llegada de CP5 (arriba) y amibaporo (abajo) a la membrana plasmática con respecto al control (paneles de la izquierda). Ya que el análisis por microscopía confocal sólo nos permite evaluar cualitativamente la señal de pocas células, se realizó una citometría de flujo para cuantificar la señal de una población más grande.

La citometría de flujo, al igual que la microscopía confocal, mostró que los niveles de CP5 en la superficie no se vieron afectados (Figura 45, izquierda). Esto confirmó que la localización a nivel de la membrana plasmática de CP5 no se ve afectada por la disminución de la proteína Sec61.

En el caso de amibaporo (Figura 45, derecha), la citometría de flujo mostró, sorprendentemente, un incremento específico y significativo de los niveles de éste en la membrana plasmática de trofozoítos tratados con el PNA antisentido. Esto puede sugerir que existen vías alternas de secreción en este parásito, las cuales se activan por diferentes estímulos, como, por ejemplo, la disminución de la actividad de la vía de Sec61. De acuerdo con lo reportado previamente (Manning-Cela, 2003), estas rutas alternas pueden no ser constitutivas y sólo afectar específicamente algunos de los procesos celulares, en éste caso sólo afectar amibaporo pero no CP5.



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Figura 44. Localización a nivel de membrana plasmática de proteasa de cisteína 5 y amibaporo. Arriba, proteasa de cisteína 5; Abajo, amibaporo. Paneles de la izquierda, amibas control; Paneles centrales, amibas tratadas con PNA antisentido; Paneles de la derecha, amibas tratadas con PNA *scrambled*. Se utilizó el PNA sin modificaciones contra EhSec61.

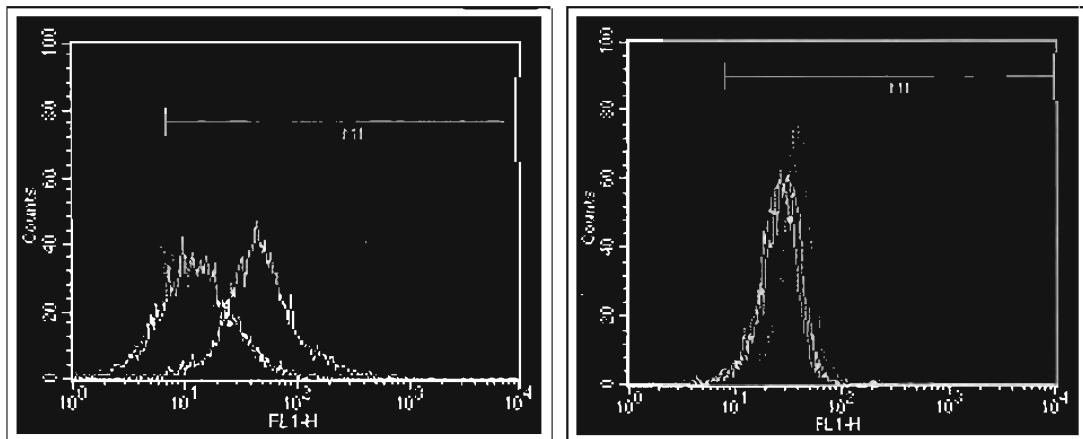


Figura 45. Cuantificación por citometría de flujo a nivel de membrana plasmática de proteasa de cisteína 5 y amibaporo. Izquierda, amibaporo; Derecha, proteasa de cisteína 5. En verde se denota las amibas tratadas sólo con el anticuerpo secundario fluorescente; Rojo, las amibas control; Café, amibas tratadas con el PNA *scrambled*; Azul, amibas tratadas con el PNA antisentido. Se utilizó el PNA sin modificaciones contra EhSec61.

Estudios de formación de abscesos hepáticos en hámster.

Por último, en la evaluación del uso de PNAs en la amiba, se realizaron estudios de formación de abscesos hepáticos en hámster. Se preincubaron trofozoítos amibianos durante 96 h a 37 °C con y sin 20 μ M de los PNA sin modificaciones antisentido y *scrambled*. Una vez transcurrido el tiempo, las amibas se contaron y se inocularon 1×10^6 amibas/hámster en la vena porta. Se utilizaron cuatro animales por grupo, los cuales se sacrificaron al séptimo día y los hígados se pesaron. El peso de los hígados se utilizó como parámetro indicativo del grado de formación de abscesos, ya que la masa de los hígados incrementa proporcionalmente al daño hepático.

Como se muestra en la tabla 6, los promedios de los hígados de los tres grupos no resultaron ser significativamente diferentes. Este resultado fue inesperado, ya que aunque los niveles membranales de los factores de virulencia analizados (amibaporo y CP5) no se afectaron, esperábamos que los trofozoítos de lenta proliferación (tratados con el PNA antisentido para Sec61) presentaran una formación de abscesos hepáticos disminuída.

Esto puede deberse a: A) Una inhibición del 65-80% de la proteína Sec61 no es suficiente para inhibir la secreción de los componentes citotóxicos (por ejemplo; CP5 y amibaporo), lo cual apoya los resultados de localización de éstos a nivel de membrana; B) Aunque quizás disminuya la secreción de otros componentes citotóxicos, que no hemos medido, la concentración alcanzada por éstos es suficiente para dañar el tejido hepático; C) La secreción de los componentes citotóxicos no es mediada por la ruta de Sec61.

Al realizar estudios de la misma manera que los mencionados, pero con un refuerzo intraperitoneal del PNA cada 24 h por 5 días, se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos previamente sin los refuerzos: presencia de abscesos hepáticos de extensión media similar en todos los grupos.

Tabla 6. Peso de los hígados de hámsters. Después de una semana de la inoculación intraportal de trofozoítos tratados con PNA y controles.

Tratamiento	Peso de los hígados (g)		
	Control	<i>Scrambled</i> PNA	Antisentido PNA
Hamster 1	9.98	6.09	6.57
Hamster 2	10.32	5.43	4.96
Hamster 3	5.76	7.72	7.01
Hamster 4	6.00	15.9	8.26
Promedio \pm SD	8.02\pm2.47	8.79\pm4.84	6.70\pm1.36

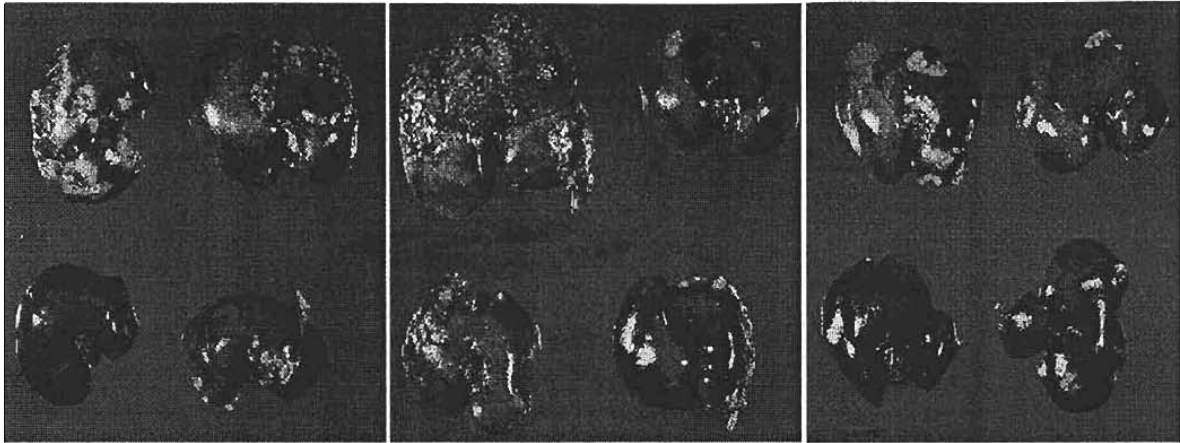


Figura 46. Fotografía de los hígados de los hámsters. Izquierda, amibas control; Centro, amibas tratadas con el PNA *scrambled*; Derecha, amibas tratadas con el PNA antisentido.

CONCLUSIONES

PNAs sin modificar son capaces de inhibir específicamente la síntesis de proteínas en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

Los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* son del orden de 100 veces más permeables a PNAs derivatizados con miristato que a los PNAs sin modificar.

PNAs derivatizados en ambos extremos pierden la capacidad de inhibir específicamente la síntesis de proteína en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

La permeabilidad a PNAs derivatizados con palmitato parece ser secuencia dependiente en trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

La determinación de la T_m puede ser una prueba predictiva del funcionamiento de los PNAs no derivatizados con ácidos grasos.

La determinación de la KD (por medio de Biacore) puede ser una prueba predictiva del funcionamiento de los PNAs no derivatizados con ácidos grasos.

La disminución de los niveles de la proteína EhSec61 en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* no afecta la capacidad de éstos de formar abscesos hepáticos en hamsters.

La inhibición inespecífica de los PNAs derivatizados con miristato no parece ser a nivel de traducción, ya que éstos no inhibieron la traducción del ARNm total de amiba en ensayos *in vitro*.

La propiedad hidrofóbica del PNA adquirida por el miristato se pierde al conjugarlos por medio de una cistina-1,2 diaminoetano.

Es imperativo que el conjugado PNA-miristato se separe dentro de la célula para la adecuada funcionalidad (inhibición) de los PNAs.

Al margen de limitaciones de costo y de criterios de diseño, la utilización de PNAs no modificados como agentes supresores de la expresión génica en *Entamoeba histolytica* es promisoro y puede ser una herramienta útil para estudios de función génica.

PERSPECTIVAS

Determinar si las modificaciones con ácidos grasos en el carboxilo terminal no interfieren con la funcionalidad del PNA.

Determinar las T_m de los diferentes PNAs utilizando como blanco oligorribonucleóticos.

Buscar linkers reducibles que no interfieran con la propiedad hidrofóbica conferida al aducto por el miristato.

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. (1999) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cythopathic 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. (2000) Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 34:463-472.

Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D., 2003. Transcriptional Silencing of an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect on Pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 2, 295-305.

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.

Carrero JC, Laclette JP, (1996). Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: A Review. *Arch. Med. Res.* 27:403-412.

Cavalier-Smith T, (1993). Kingdom protozoa ant its 18 phyla. *Microbiol Rev.* 57:953-994.

Chávez-Munguía B, Espinosa-Cantellano M, Castañón G, Martínez-Palomo A. (2000) Ultraesrtuctural evidence of smooth endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.* 31:S165-S167.

- Clark CG, Roger AJ, (1995). Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6518-6521.
- 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.
- Das, S., Lohia, A., 2002. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* 4, 55-60.
- DeMartino GN, Slaughter CA, (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *The journal of biological chemistry.* 274(32):22123-22126.
- Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C., 1978. A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 413-432.
- 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.
- Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B and Nielsen PE. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature.* 365:556-568.
- Egholm M, Christensen L, Dueholm KL, Buchardt O, Coull J, and Nielsen PE (1995). Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Research* 25(2):217-222.
- Espinosa-Castellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Arguello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo, (1998). *Entamoeba dispar*. Ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Euk. Microbiol.* 3:265-272.
- Espinosa-Castellano M, Martínez-Palomo A (2000) Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13(2):318-31.
- 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.

Giesen U, Kleider W, Berding C, Geiger A, Orum H and Nielsen PE (1998). A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/AND duplexes. *Nucleic Acids Res.* 26:5004-5006.

Good L, Awasthi SK, Dryselius R, Larsson O, and Nielsen PE, (2001). Bactericidal antisense of peptide-PNA conjugates. *Nature Biotech.* 19: 360-364.

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* STT3 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.

Hellberg A, Sommer A, Bruchhaus I, (1999). Primary sequence of a putative non-ATPase subunit of the 26S proteasome from *Entamoeba histolytica* is similar to the human and yeast S2 subunit. *Parasitol Res.* 85:417-420.

Hochstrasser M, (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the

regulation of intracellular protein degradation. *Current Opinion in Cell Biology.* 7:215-223.

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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 4:1 (5-23).

Jackson TFHG, (1998) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol.* 28:181-186.

Jensen KK, Orum H, Nielsen PE and Norden B (1997). Hybridization kinetics of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with BIAcore technique. *Biochemistry.* 36:5072-5077.

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.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680.

Leippe M, (1995) Ancient weapons: NK-Lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* 83:17-18.

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, 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.

Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langle U, (2000). Cell-penetrating peptides. *TIPS.* 21:99-103.

Lujan H, Diamon L, (1997). Cholesterol requirement and metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Research* 28:96-97.

Manning-Cela, R., Marquez, C., Franco, E., Talamás-Rohana, P., Meza, I., 2003. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cellular Micro.* 12: 921-932.

Martinez-Palomo A (1989) 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.

Martinez-Palomo A, (1982). The biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Chichester.

Martinez-Palomo A, (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In "Amebiasis". A Martinez-Palomo (Ed.) Elsevier. Amsterdam. Human Parasitic Diseases Series. 2:11-43.

Martinez-Palomo A, (2000). Parasitic amebas of the intestinal tract en: *Obra seleccionada. El colegio nacional.* México. pp. 99-176.

Mellman I, Warren G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100:99-112.

- Millo E, Nicolai R, Scarfi S, Scapolla C, Biasotti B, Benatti U, Damonte G, (2002). Optimised solid phase synthesis of a cystine-linked peptide-PNA chimera. *Tetrahedron Letters* 43:3057-3059.
- 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.
- Nikiforov TT, Jeong S (1999). Detection of hybrid formation between peptide nucleic acids and DNA by fluorescence polarization in the presence of polylysine. *Analytical Biochemistry*. 275: 248-253.
- Olivos-García, A., Nequiz-Avendaño, M., Tello, E., Martínez, R.D., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2004. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Experimental and Molecular Pathology* 77, 66-71.
- 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 T, Mann BJ, Broman J, Ravdin JI. (1989) Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 264(5):3007-3012.
- Petri W and Ramakrishnan G, (1999). Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Trends in Microbiology.* 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.
- Pooga M, Soomets U, Hallbrink M, Valkna A, Saar K, Rezaei K, Kahl U, Jun Xu X, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T, Bartfai T, Langel U, (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission un vivo. *Nat. Biotechnol.* 16:857-861.
- Que, X., Reed, S.L., 1997. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2:196-206.
- Ramos M.A, Stock R.P, Sánchez-Lopez R, Olvera F, Lizardi P.M, Alagón A, (1997). The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 84: 131-135.
- 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 hystolitica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88, 225-235.
- Ramos, M.A., Alagón, A., 2000. Molecular cloning of a gene encoding a PDI-Like protein from *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 31, S173-S175.
- 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.
- Rodríguez MA, Garcia-Perez RM, Garcia-Rivera G, Lopez-Reyes I, Mendoza L, Ortiz-Navarrete V, Orozco E (2000) An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol* 108 (2):199-206.
- 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.

Saito-Nakano Y, Yasuda T, Shigeta Y, Nakazawa M, Takeuchi T, Nozaki T (2000) Identification and characterization of a rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31(4):S155-6.

Sakaguchi M (1997) Eukaryotic protein secretion. *Curr Op Biotechnol* 8:595-601.

Sánchez R, Alagón A, Stock R, (2002). *Entamoeba histolytica*: Intracellular distribution of the proteasome. *Exp. Parasitol.* 102:187-190.

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, 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.

SantaLucia J, Allawi HT and Seneviratne PA (1996). Improved nearest neighbour parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry.* 35:3555-3562.

Scarfi S, Gasparini A, Damonte G, and Benatti U (1997). Synthesis, Uptake and intracellular metabolism of a hydrophobic tetrapeptide-peptide nucleic acid (PNA)-biotin molecule. *Biochemical and biophysical research communications.* 236:323-326.

Solís F, Orozco E, Córdova L, Rivera B, Luna-Arias JP, Gómez Conde E, Rodríguez MA, (2002). *Entamoeba histolytica*: DNA carrier vesicles in nuclei and kinetoplast-like organelles (EhkOs). *Mol. Genet. Genomics* 267:622-628.

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.

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.

Temesvari LA, Harris EN, Stanley SL Jr, Cardelli JA (1999) Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol* 103(2):225-41.

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.

Vargas-Rodríguez L, Villagómez-Castro JC, Flores-Carreón A, López-Romero E. (1998). Identification and characterization of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *E. histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 28:1333-1340.

Villa R, Folini M, Lualdi S, Veronese S, Daidone M, Zaffaroni N, (2000). Inhibition of telomerase activity by a cell-penetrating peptide nucleic acid construct in human melanoma cell. *FEBS Letters* 473:241-248.

Walsh JA, (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8:228-238.

Willhoeft U and Tannich E. (1999) The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99:41-53.



Inhibition of Neomycin Phosphorotransferase Expression in *Entamoeba histolytica* with Antisense Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomers

Roberto P. Stock,* Alejandro Olvera,* Sonia Scarfi,** Ricardo Sánchez,* Marco A. Ramos,* Lidia C. Boffa,*** Umberto Benatti,** Olfert Landt**** and Alejandro Alagón*

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

**Istituto Politecnico di Chimica Biologica (IPBC), University of Genoa, Genoa, Italy

***Oncologia Sperimentale, National Cancer Institute, Genoa, Italy

****TIB MOLBIOL, Berlin, Germany

Key Words: *Entamoeba histolytica*, PNA, Antisense, Neomycin.

Introduction

PNA are DNA analogs in which the entire phosphate-sugar backbone has been replaced by an isomorphous pseudopeptidic chain to which the four bases are linked. They have been shown to bind complementary natural polynucleotide sequences with higher affinity than their natural counterparts, partially due to the high flexibility and absence of charge of the artificial backbone. Furthermore, their artificial structure is not recognized by proteases and nucleases, making PNA exceptionally stable in biological environments (1). This consideration is of particular relevance to *Entamoeba histolytica*, as it possesses numerous hydrolases, some membrane bound. PNA oligomers have been used in the last few years as antisense and antigene agents in a variety of cell-free and cellular systems, showing that they can effectively and selectively downregulate gene expression at the translational or transcriptional levels when used at micromolar concentrations (2). 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 inactivation. Only recently, antisense strategies using plasmids transcribing antisense mRNAs have been successfully used, allowing the downregulation of specific genes and the analysis of resulting phenotypes (3). In this study, we report the use of PNA oligomers as antisense agents for effective and specific downregulation of expression of the bacterial gene

neomycin phosphorotransferase (NPT) in *E. histolytica* in culture, with results comparable to antisense strategies recently reported. In contrast to other cellular types tested, notably 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.

Materials and Methods

Cells and culture. All experiments were performed using the HK9 and HM-1:IMSS strains. Results were equivalent in both strains in all cases. Cells were grown in standard TY-S medium supplemented with 15% newborn-calf serum.

PNA synthesis, modification, and quality control. PNA oligomers were synthesized manually using solid phase peptide synthesis (SPPS) by tBoc or Fmoc chemistries using appropriate resins, as previously described (4). Purity of the oligomers was greater than 95% by mass spectrometry. The PNA synthesized were 17-mers complementary to the first 17 nucleotides of the NPT mRNA coding sequence (NEO17ATG), designed for antiparallel hybridization (the 3' end of the PNA corresponding to the amidated C-terminus), and as control, a scrambled sequence of identical composition was synthesized. The PNA oligomers synthesized for this study were: NEO17ATG: CONH₂-TACTAACTTGTTC-TACC-NH₂ and NEO17SCR: CONH₂-CATATAICTTG-TACTCT-NH₂.

Cell transfection and vectors. *E. histolytica* trophozoites growing exponentially were transfected using effectene lipofection reagent (Boehringer, Mannheim, Germany) as instructed by the manufacturer, except that lipofection was

Address reprint requests to: Alejandro Alagón, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Tel.: (+52) (73) 291-602, FAX: (+52) (73) 152-388, E-mail: alagon@ibt.unam.mx

Presenting author: Roberto P. Stock

done in Optimem (Gibco, BRL, Rockville, MD, USA). Selection of transformants was performed with increasing amounts of G418 (Geneticin, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), and proliferation and NPT activity experiments were performed with trophozoites growing in medium containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antibiotic, corresponding to a resistance index of 4. The vector used in these experiments, pTCV4, is a minimized derivative of the pTCV1 plasmid previously described by Petri and coworkers.

Measurement of NPT activity. Neomycin phosphotransferase activity was measured in cell extracts obtained from PNA-treated and control cultures by a slot-blot assay using kanamycin as substrate for phosphorylation (5). The amount of radioactive kanamycin was measured by autoradiography in a phosphorimager system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) and 2D densitometric analysis, with the freeware package NIH-Image version 1.62. Results are plotted as percent of control activity \pm standard deviation (SD).

Results and Discussion

Neomycin phosphotransferase activity in PNA-treated trophozoites. Cells grown in 5-mL cultures in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 were incubated with 20 μM of PNA oligomers and collected at 96 h. Lysates were obtained, protein concentration normalized, and identical quantities of total protein used for the kanamycin phosphorylation assay. An autoradiogram of the slot-blot assay is shown in Figure 1 (left panel). Two-dimensional densitometry (middle panel) revealed that inhibition of NPT activity was 70% (right panel). Inhibition of NPT activity was restricted to the antisense sequence, as the scrambled control PNA did not have a significant effect. Results of the densitometry readings are plotted as percent of NPT activity of untreated controls. The decrease in NPT activity showed a clear concentration dependence, with negligible effects under 5 μM and maximal effects at 20 μM (data not shown). This level of inhibition is comparable to those recently reported for amebapore and the light chain of the Gal-NAc lectin genes, downregulated by means of antisense mRNA transcription from plasmids. Kinetic studies of NPT activity showed that a decrease in activity was apparent after 48 h ($\sim 25\%$) of incubation with 20 μM antisense PNA, and maximal at 96 h (data not shown).

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 patho-

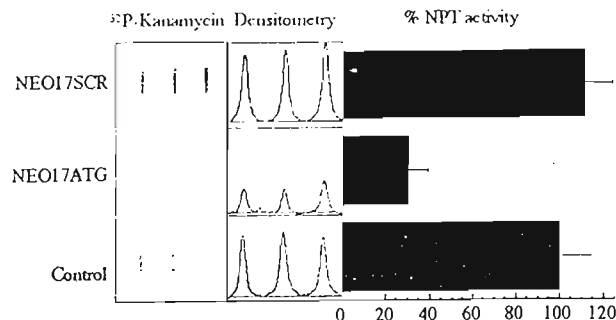


Figure 1. Neomycin phosphotransferase activity of lysates of HK9 trophozoites incubated with 20 μM antisense (NEO17ATG) and scrambled (NEO17SCR) PNA for 96 h. Left panel: autoradiograph of slot blot of ^{32}P -kanamycin; middle panel: densitometric analysis of slot blot, and right panel: percent inhibition (\pm SD) of antisense and scrambled PNA by comparison to untreated control.

genic protozoans of particular importance in the tropical and subtropical world. Undergoing research on genes associated with drug resistance and invasion/virulence factors may benefit from the use of PNA. PNA oligomers can be manually synthesized and purified in the laboratory in scales needed for *in vitro* and small animal *in vivo* work. As shown for antisense agents in mammalian cells, appropriate signals may be designed to improve delivery into *E. histolytica* cells, as well as for nuclear localization for studies on transcriptional inhibition of gene expression. Although more studies on laboratory animals are necessary, PNA may be a feasible gene-therapeutic agent against amebiasis, provided that appropriate vectors for delivery and optimal target sequences are identified.

Acknowledgments

We wish to acknowledge the support of X Alvarado (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico), and of E Millo and G Damonte (IPCB, Genoa, Italy). This work was supported in part by grant no. N-27826 from Conacyt (Mexico).

References

1. Hyrup B, Nielsen P. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem* 1996;1:5.
2. Soomets U, Hallbrink M, Langel U. Antisense properties of peptide nucleic acids. *Front Biosci* 1999;4:D782.
3. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 1999;34:463.
4. Grovine M, Gasparini A, Searfi S, Damonte G, Sturla L, Millo E, Tonetti M, Benatti U. Synthesis and characterization of a specific peptide nucleic acid that inhibits expression of inducible NO synthase. *FEBS Lett* 1998;426:33.
5. Platt SG, Yang N-S. Dot assay for phosphotransferase activity in crude cell extracts. *Anal Biochem* 1987;162:529.

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

Roberto P. Stock¹, Alejandro Olivera¹, 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 amebiasis, 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 isomorphous 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^{7,8}.

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 cycle¹²; (3) cells in axenic culture exhibit a variable number of nuclei (commonly one to two, more rarely three or more)¹⁴ 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 uncertain 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 G418, 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 Morelos, Mexico. ²Institute of Biochemistry, University of Genoa, Viale Benedetto XV, 1-16132, Italy.

³National Cancer Institute, IST, Largo R. Benzi, 16132 Genoa, Italy. *Corresponding author (alagon@ibt.unam.mx).

RESEARCH ARTICLE

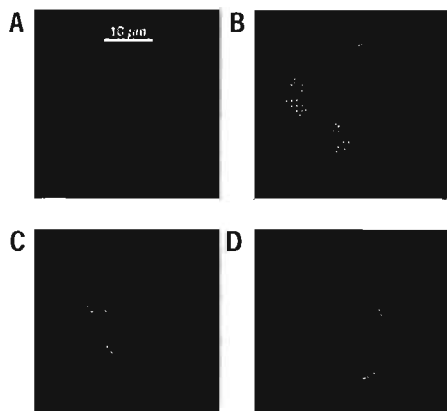


Figure 1. Distribution of antisense biotinylated PNAs in trophozoites of strain HK9 after 2 h (A,B) and 24 h (C,D) incubation with 20 μ M PNA. Confocal image representative of numerous studies with PNAs of different lengths and composition (from 13- to 20-mer) shows a diffuse cytosolic distribution with 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 this 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 cells^{19,20}, 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 function¹⁹. 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 HIM-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

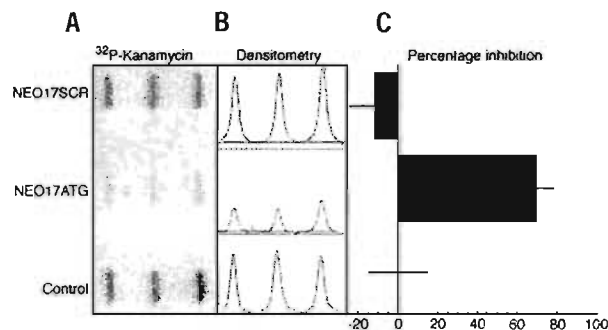


Figure 2. Neomycin phosphotransferase activity of lysates of HK9 trophozoites treated with 20 μ M NEO17ATG antisense PNA for 96 h. For comparison, 20 μ M NEO17SCR is a random PNA of identical base composition. (A) Autoradiogram of slot blot of ³²P-labeled kanamycin. (B) Densitometry of autoradiogram 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.

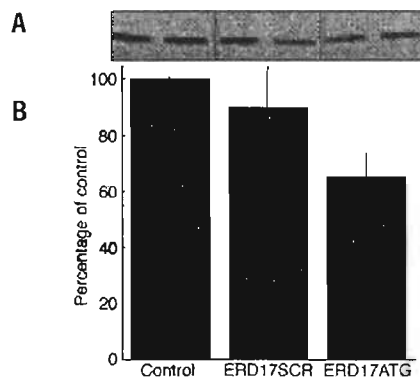


Figure 3. EhErd2 protein levels in lysates of HK9 trophozoites treated with 10 μ M ERD17ATG antisense PNA for 96 h. (A) Western blot of EhErd2. (B) Percentage inhibition by densitometry (by comparison to untreated control).

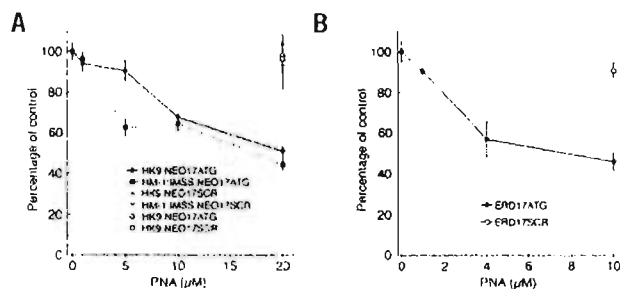


Figure 4. Effect of PNA treatment on trophozoite growth. (A) Treatment with anti-NPT PNA. Identical inocula of pTCV4-transformed HK9 (solid line) or HM-1:MSS (dashed line) trophozoites were cultured in medium with 10 µg/ml G418 with varying concentrations of NEO17ATG or NEO17SCR PNA (triangles). The 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 common¹¹, mRNA levels likely vary widely from cell to cell. Thus, the 55% inhibition of proliferation by NEO17ATG and the 53% inhibition by ERD17ATG 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 trophozoites¹⁷. 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:MSS 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 peptide synthesis (SPPS) 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-TACTAACTTCTCTACC-NH₂; for NEO17SCR, CONH₂-CATATATCTTCTACTCT-NH₂. The PNAs complementary to EhErd2 mRNA were as follows: for ERD17ATG, CONH₂-TACCACAAATAGAAAA-NH₂; for ERD17SCR, CONH₂-CAATACATAAGATAACA-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 (Nestle, 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 Effectene 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 plasmid²³.

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 E-64, 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 μ g of lysate protein to an excess kanamycin and [γ^{32} P]-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 freeware 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-Erd2 rabbit antibody (at 1 μ g/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 μ g/ml G418 when appropriate, for each time point by direct counting using a hemocytometer (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, 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 Alvarado, Enríco Millo, Gianluca Damonte, and Drs. Paul Lizardi, Marlo Zurita and Eduardo Horjales.

Received 22 May 2000; accepted 18 December 2000

- Bloom, B. & Cerami, A. Biomedical science and the third world: under the volcano. *Ann. NY Acad. Sci.* **569**, 36–44 (1989).
- Hyrup, B. & Nielsen, P. Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg. Med. Chem.* **1**, 5–23 (1996).
- Soomets, U., Hallbrink, M. & Langel, U. Antisense properties of peptide nucleic acids. *Front. Biosci.* **4**, D782–786 (1999).
- Pooga, 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**, 784–787 (1999).
- Cutrona, 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. & Wöstrmann, C. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today* **9**, 27–31 (1993).
- Bhattacharya, A., Satish, 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., Harlow, D.R. & Cunnick, C.C. A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 413–432 (1978).
- Martínez-Palomo, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. (John Wiley & Sons, Chichester, England: 1982).
- López-Revilla, R. & Gomez, R. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, and *E. moshkovskii*: fluctuation of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* **44**, 243–248 (1978).
- Willhoelt, U. & Tannich, E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**, 41–53 (1999).
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M. & Mirelman, D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 463–472 (1999).
- Ankri, 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).
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N. & Pelham, 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 (1998).
- 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**, 33–36 (1998).
- Dhar, S.K., Vines, R.R., Bhattacharya, S. & Petri, W.A. Ribosomal DNA fragments enhance the stability of transfected DNA in *Entamoeba histolytica*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 656–660 (1998).
- Platt, S.G. & Yang, N.S. Dot assay for phosphotransferase activity in crude cell extracts. *Anal. Biochem.* **162**, 529–535 (1987).

Entamoeba histolytica: intracellular distribution of the proteasome

Ricardo Sánchez, Alejandro Alagón, and Roberto P. Stock*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received 6 May 2002; received in revised form 28 November 2002; accepted 28 March 2003

Abstract

We have studied the intracellular distribution of proteasome subunits, corresponding to the catalytic (20S) core and the regulatory (19S) cap, in the extracellular protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Contrary to all cell types described to date, notably mammalian and yeast, in which the proteasome is found in the nucleus and actively imported into it, microscopic analysis and subcellular fractionation of *E. histolytica* trophozoites show that the proteasome is absent from the nucleus of these cells. We speculate that, given the relative abundance of mono- and multinucleated trophozoites in culture, a relationship may exist between this unusual distribution of the proteasome and the frequent lack of synchrony between karyo- and cytokinesis in this primitive eukaryote.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Proteasome; Co-localization; Cell cycle

In *Entamoeba histolytica*, the extracellular intestinal parasitic protozoan which is the etiological agent of amebiasis, the existence of a functional proteasome has been reported. This was determined by the purification of a proteolytic protein complex with a sedimentation value of 20S and which exhibits cross-reactivity with an antibody against proteasomal α subunits (Scholze et al., 1996). In addition, a functional ubiquitin-conjugating system has been described in *E. histolytica* (Wostmann et al., 1996) and expressed genes homologous to an α -subunit and a non-ATPase S2 subunit of the human and yeast proteasome have been identified in this parasite (Hellberg et al., 1999; Ramos et al., 1997). The function of the proteasome has also been studied with inhibitors (such as lactacystin) in *Entamoeba invadens* and *E. histolytica* in its relation to trophozoite proliferation and differentiation into cysts (Gonzalez et al., 1999; Makioaka et al., 2002).

In eukaryotic organisms, much of the regulated protein degradation is carried out by the proteasome. The proteasome is implicated in numerous biological processes which include the proteolysis of abnormal or misfolded proteins, cell-cycle control, cell differentia-

tion, metabolic adaptation, and in higher eukaryotes, in the cellular immune response. Many of these functions are ATP-dependent and linked to an ubiquitin-conjugating system involving the 26S proteasome (Jentsch and Schienker, 1995). The eukaryotic 26S proteasome is a cylindrical complex of approximately 2100 kDa consisting of two particles, the 20S proteolytic core and the 19S regulatory cap. The 20S proteasome is a 700 kDa protein assembly, composed of 14 homologous α subunits and 14 homologous β subunits, arranged as four axially stacked heptameric rings. The two inner rings are composed exclusively of β subunits, which possess the catalytic activity, whereas the two outer rings are composed exclusively of α subunits which have no enzymatic activity. The regulatory cap can bind to one or both of the outer rings of the 20S proteasome. Once bound, it confers upon the 20S core the specific ubiquitin- and ATP-dependent protein degradation activity. This 19S regulatory cap is a 700 kDa protein complex consisting of 20 subunits which fall into two classes, the ATPases, which contain a homologous 200-amino acid domain with ATP binding motifs and the non-ATPase proteins (DeMartino and Slaughter, 1999).

In mammalian cells, the proteasome is found both in the nucleus and in the cytoplasm, with a higher abundance, generally, in the latter although it is actively

* Corresponding author. Fax: +52-777-172388.

E-mail address: rstock@ibt.unam.mx (R.P. Stock).

imported into the former (Palmer et al., 1996; Peters et al., 1994; Yang et al., 1995). In an unicellular eukaryote such as yeast, proteasomes are localized almost exclusively in the nucleus (Enenkel et al., 1998; Russell et al., 1999; Wilkinson et al., 1998).

Entamoeba histolytica is an unusual eukaryotic cell in many respects. It is a morphologically simple organism, as no organelles such as mitochondria, peroxisomes, endoplasmic reticulum (ER), and Golgi system are apparent, and cytoskeletal organization is conspicuously absent (Bakker-Grunwald and Wostmann, 1993). In addition, axenically cultured trophozoites have the peculiarity that multinucleated cells are common, indicating that nuclear division and cytokinesis are often uncoupled (Das and Lohia, 2002), a feature it shares with some primitive amitochondriate eukaryotes (Margulis and Dolan, 1997).

To determine the subcellular localization of the *E. histolytica* 20S and 26S proteasome complexes, we produced two specific antibodies: one against a component of the 20S proteolytic core and the other against one of the 19S regulatory cap. From an *E. histolytica* DNA sequence homologous to ScPUP2 (an α subunit of the yeast

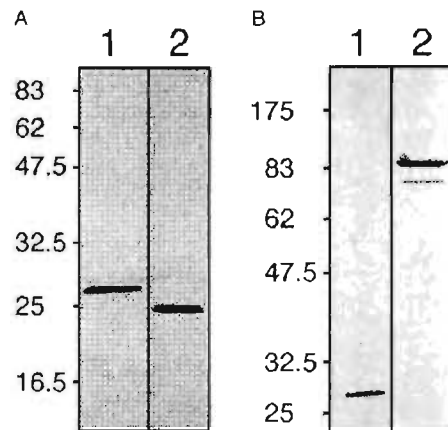


Fig. 1. (A) Specific immunodetection of recombinant α and S2 subunits by purified antibodies. Lane 1: 100 ng of lysate protein from *Escherichia coli* expressing recombinant EhaS probed with immunopurified rabbit anti-EhaS. Lane 2: 100 ng of lysate protein from *E. coli* expressing the recombinant fragment (25 kDa) of EhS2 probed with immunopurified rabbit anti-EhS2. (B) Detection of EhaS and EhS2 in *Entamoeba histolytica* lysates (25,000 cells) with immunopurified antibodies. Lane 1: rabbit anti-EhaS. Lane 2: rabbit anti-EhS2. The working concentration of anti-proteasome antibodies was 2 μ g/ml, secondary antibody was an anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate (Zymed) and the substrate was BCIP/NBT (Zymed).

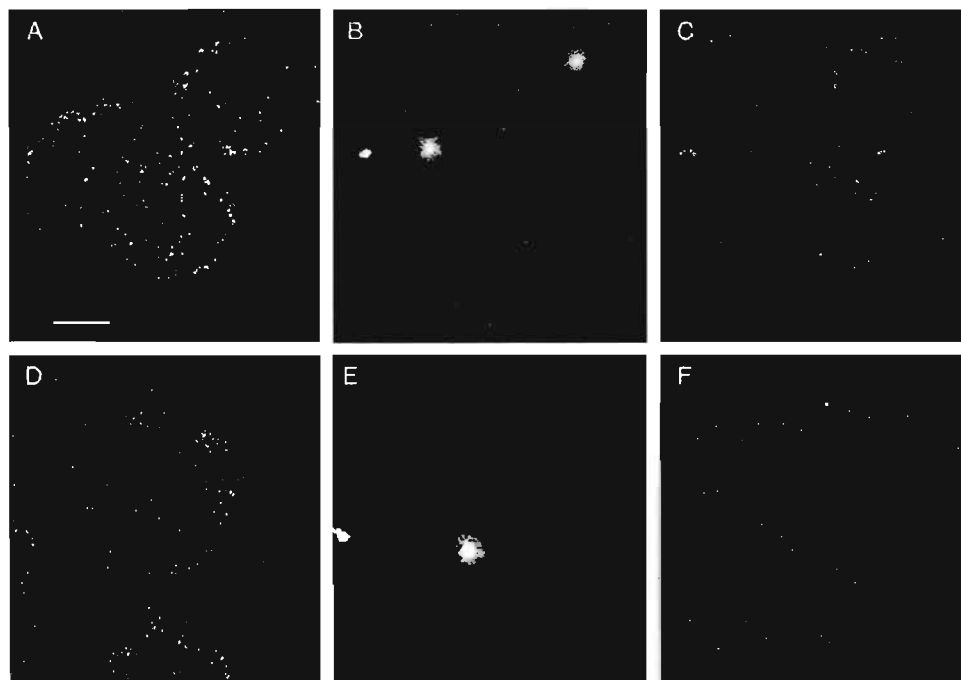


Fig. 2. Detection of 20S and 19S proteasome subunits in paraformaldehyde-fixed *Entamoeba histolytica* trophozoites. (A–F) Maximum intensity projections of equatorial confocal slices (0.18 μ m z-step) of propidium iodide and rabbit-anti-proteasome-stained trophozoites. Immunodetection of EhaS of the 20S complex (A) and EhS2 subunit of the 19S complex (D). Panels (B) and (E) show DNA staining with propidium iodide. The superimposition of the data of both channels is shown in panels (C) and (F) (proteasome in green and DNA in red). *Entamoeba histolytica* trophozoites of the HK9 strain were cultured axenically at 37 $^{\circ}$ C in TYI-S-33 medium (HM-1:IMSS trophozoites showed an identical staining pattern, data not shown). Exponentially growing trophozoites were allowed to adhere onto coverslips and fixed, permeabilized and stained as described previously (Juárez et al., 2001). Anti-proteasome antibodies were used at 10 μ g/ml and secondary antibody was a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugate at 2 μ g/ml (Molecular Probes). Propidium iodide was used at 1 μ g/ml after RNase treatment of the cells. Confocal datasets were collected with a BioRad MRC600 confocal system fitted on a Zeiss Axioskop with a collar-corrected Planapochromat 100 \times NA 1.4 oil immersion objective under fully confocal conditions and using appropriate filter blocks. Controls with only secondary antibody conjugate gave no detectable signal at the power, exposure, and gain settings used. Bar is 10 μ m.

proteasome; Coux et al., 1994) that we previously reported (Ramos et al., 1997). We cloned, expressed, and purified a His-tagged 26 kDa α -subunit recombinant protein (Eh α S). This protein was used as immunogen to produce rabbit antiserum against the 20S proteasome. Rabbit antibodies against the 19S regulatory complex were obtained using a 25 kDa recombinant protein (EhS2) as immunogen. This protein spans 257 amino acids of the C-terminus of an *E. histolytica* homologue of a yeast and mammalian non-ATPase S2 subunit (Hellberg et al., 1999). Antibodies were purified by affinity chromatography against affinity-purified recombinant immunogens. As shown in Fig. 1 (panel B, lane 1), the antibodies obtained against the α subunit of *E. histolytica* (Eh α S) recognize a single band of the expected size (\approx 25 kDa) in ameba lysates. In the case of the antibodies against EhS2, these recognize predominantly a high molecular mass band (Fig. 1, panel B, lane 2). The high molecular weight band corresponds to the predicted (92 kDa) molecular mass of the complete EhS2 protein (Hellberg et al., 1999).

In *E. histolytica*, nuclear localization of Eh α S (20S complex) and EhS2 (19S complex) was not apparent by high resolution confocal microscopy datasets. Equatorial optical slices of doubly stained trophozoites clearly show that both 20S (Figs. 2A–C) and 19S (Figs. 2D–F) proteasome subunit signals fail to localize in the nucleus as defined by propidium iodide staining. Instead, all signal, from both subunits, was observed exclusively in the cytosol, exhibiting a homogeneous distribution throughout the volume of the trophozoites without any apparent exclusion of compartments that would resemble the ER and Golgi apparatus, as observed in other cell types (Reits et al., 1997). The exclusion of Eh α S and EhS2 from the nucleus is striking, since in all cells studied to date the proteasome is present in both the cytosol and nucleus, and in yeast most of it is in the nucleus.

To verify this finding, we purified whole trophozoite nuclei by gentle lysis and performed an immunoblot of nuclear and cytosolic extracts of trophozoites (Fig. 3). The results are clear—most if not all signals of the 20S and 19S proteasome is cytosolic. If there are functional proteasomes in the nucleus of trophozoites, they are in very low quantity. A blot with nuclear extracts probed with a monoclonal antibody against histones and antibody against Eh α S was performed to demonstrate the integrity of the nuclear fraction used (Fig. 3, inset). These results confirm the previous microscopic observation and prove a novel proteasome distribution in *E. histolytica* trophozoites.

It has been put forth that the activities of the proteasome fall into two categories: degradation of relatively long-lived proteins in the cytosol and rapid turnover of short-lived proteins in the nucleus. The latter has been shown to be related to regulation of the cell cycle (Hochstrasser, 1995). In *S. cerevisiae*, the nuclear fraction

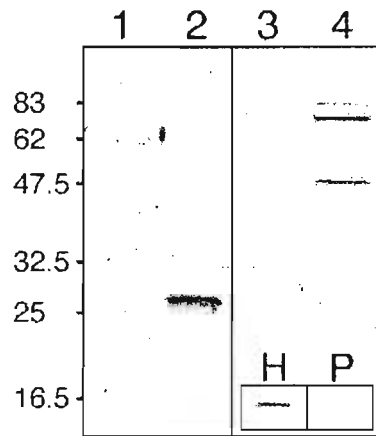


Fig. 3. Detection of Eh α S and EhS2 subunits in nuclear and cytosolic extracts. Lanes 1 and 3: 25 μ g of nuclear fraction protein. Lanes 2 and 4: 25 μ g of cytosolic fraction protein. Lanes 1 and 2 were probed with rabbit anti-Eh α S (20S) antibodies and lanes 3 and 4 were probed with rabbit anti-EhS2 (19S) antibodies. The 48 kDa band probably represents a minor degradation product consequence of the lengthy manipulation for purification of nuclei, as it is absent when total lysates are quickly obtained in SDS-PAGE sample buffer (see Fig. 1). Inset: slot blot of 10 μ g nuclear protein probed with an anti-histone pan monoclonal antibody (H; Boehringer #1492519, detects a conserved epitope of histones H1, H2A, H2B, H3, and H4) and anti-Eh α S (P). Trophozoites were centrifuged for 15 min at 500g and then resuspended at 9×10^6 cells/ml in 15 mM Tris-HCl/15 mM NaCl/0.5% NP40/5 mM PMSF/0.5 mM E64, pH 8. Trophozoites were lysed manually and the extent of lysis monitored under the microscope. The trophozoite lysate was centrifuged for 15 min at 500g to separate the cytosolic fraction (supernatant) from the nuclear fraction (pellet). Nuclei were washed once with 3 ml of PBS and further purified by centrifugation for 12 min at 6000g on a 1 M sucrose gradient. Protein quantitation of the cytosolic and nuclear fractions was done with the Micro BCA kit (Pierce).

seems to be crucial, as 80% of the proteasome is found in the nucleus (Russell et al., 1999). Furthermore, mutations in proteasome genes in yeast are often lethal, affecting steps in cell cycle progression (Emori et al., 1991; Fujiwara et al., 1990; Rinaldi et al., 1998; Wilkinson et al., 1997) and proteasome inhibitors have been shown to interfere with cell cycle progression and cell fate in mammalian cell systems (Fenteany and Schreiber, 1998). However in *E. invadens* proteasome function seems not to be essential for trophozoite proliferation, but only for differentiation into cysts (Gonzalez et al., 1999), whereas in *E. histolytica* lactacystin inhibits growth at relatively high concentrations (Makioka et al., 2002).

In *Schizosaccharomyces pombe*, mutations in a group of genes implicated in septum formation (*sid*, septum initiation defective) result in a block of cytokinesis but the cells undergo multiple cycles of S and M phases and become multinucleated and highly elongated before they lyse (Balasubramanian et al., 2000). In fact, failure of the proteasome to localize in the nucleus correlates with an arrest at anaphase (Tatebe and Yanagida, 2000). However, both these situations (absence of nuclear proteasome and multiple S and M rounds without cytokinesis)

seem frequent in *E. histolytica* in culture (Das and Lohia, 2002) and bi- and multi-nucleated cells are viable.

In this study we show that neither the catalytic nor regulatory proteasome complexes localize to the nucleus of *E. histolytica* trophozoites, and by analogy to studies in yeast, suggest that it may be related to the frequent lack of synchrony between karyokinesis and cytokinesis. The cell cycle is a fundamental area of research to which much effort is being devoted, and the concerted division of nuclear and cytoplasmic material has been proposed to be the result of the coordinated action of numerous structural and regulatory genes, in which the proteasome plays a central role. Studies of nuclear and cell division in cells such as those of *E. histolytica* will surely provide an instructive counterpoint to those of the cell cycle of model eukaryotic organisms in which nuclear and cell division are tightly coordinated.

Acknowledgments

We wish to thank Alejandro Olvera, Felipe Olvera, Olegaria Benítez, and the staff of the animal facilities (Elizabeth Mata, Graciela Cabeza, and Sergio González) at the Instituto de Biotecnología for excellent technical assistance, as well as Luis M. Salgado, Mario Zurita, and Andrés Saralegui for valuable comments. The anti-histone monoclonal antibody was a kind gift of Dr. Enrique Reynaud (IBU/UNAM). This study was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Grant 27826-N (Mexico) and DGAPA-UNAM Grant 207097 (Mexico).

References

- Bakker-Grunwald, T., Wostmann, C., 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol. Today* 9, 27–31.
- Balasubramanian, M.K., McCollum, D., Surana, U., 2000. Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J. Cell Sci.* 113, 1503–1513.
- Coux, O., Nothwang, H.G., Silva Pereira, I., Recillas Targa, F., Bey, F., Scherrer, K., 1994. Phylogenetic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol. Gen. Genet.* 245, 769–780.
- Das, S., Lohia, A., 2002. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 4, 55–60.
- DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 22123–22126.
- Emori, Y., Tsukahara, T., Kawasaki, H., Ishiura, S., Sugita, H., Suzuki, K., 1991. Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 11, 344–353.
- Enekel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P.M., 1998. Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* 17, 6144–6154.
- Fenteany, G., Schreiber, S.L., 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273, 8545–8548.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Orino, E., Yoshimura, T., Kumatori, A., Tamura, T., Chung, C.H., Nakai, T., Yamaguchi, K., Shin, S., Kakizuka, A., Nakanishi, S., Ichihara, A., 1990. Proteasomes are essential for yeast proliferation. *J. Biol. Chem.* 265, 16604–16613.
- Gonzalez, J., Bai, G., Frevert, U., Corey, E.J., Eichinger, D., 1999. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. *Eur. J. Biochem.* 264, 897–904.
- Hellberg, A., Sommer, A., Bruchhaus, I., 1999. Primary sequence of a putative non-ATPase subunit of the 26S proteasome from the *Entamoeba histolytica* is similar to the human and yeast S2 subunit. *Parasitol. Res.* 85, 417–420.
- Hochstrasser, M., 1995. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 215–223.
- Jentsch, S., Schienker, S., 1995. Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 82, 881–884.
- Juárez, P., Sanchez-Lopez, R., Stock, R.P., Olvera, A., Ramos, M.A., Alagón, A., 2001. Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 223–228.
- Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, Seiki, Takeuchi, T., 2002. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Res.* 88, 454–459.
- Margulis, L., Dolan, M.F., 1997. Swimming against the current. *Science* (January/February), 20–25.
- Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W., Fuertes, G., Knecht, E., 1996. Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes, and cytosol. *Biochem. J.* 316, 401–407.
- Peters, J.M., Franke, W.W., Kleinschmidt, J.A., 1994. Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269, 7709–7718.
- Ramos, M.A., Stock, R.P., Sánchez-López, R., Olvera, F., Lizardi, P.M., Alagón, A., 1997. The *Entamoeba histolytica* proteasome α -subunit gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 131–135.
- Reits, E.A.J., Benham, A.M., Plougastel, B., Neeffjes, J., Trowsdale, J., 1997. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 16, 6087–6094.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M., Frontali, L., 1998. A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol. Biol. Cell* 9, 2917–2931.
- Russell, S.J., Steger, K.A., Johnston, S.A., 1999. Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 21943–21952.
- Scholze, H., Frey, S., Cejka, Z., Bakker-Grunwald, T., 1996. Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 271, 6212–6216.
- Tatebe, H., Yanagida, M., 2000. Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. *Curr. Biol.* 10, 1329–1338.
- Wilkinson, C.R.M., Wallace, M., Seeger, M., Dubiel, W., Gordon, C., 1997. Mts4, a non-ATPase subunit of the 26S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2. *J. Biol. Chem.* 272, 25768–25777.
- Wilkinson, C.R.M., Wallace, M., Morphey, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J.P., McIntosh, J.R., Gordon, C., 1998. Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *EMBO J.* 17, 6465–6476.
- Wostmann, C., Liakopoulos, D., Ciechanover, A., Bakker-Grunwald, T., 1996. Characterization of ubiquitin genes and -transcripts and demonstration of a ubiquitin-conjugating system in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 82, 81–90.
- Yang, Y., Früh, K., Ahn, K., Peterson, P.A., 1995. In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.* 270, 27687–27694.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Experimental Parasitology xxx (2005) xxx–xxx

**Experimental
Parasitology**

www.elsevier.com/locate/yexpr

Entamoeba histolytica: intracellular distribution of the sec61 α subunit of the secretory pathway and down-regulation by antisense peptide nucleic acids

Ricardo Sánchez^a, Andrés Saralegui^a, Alfonso Olivos-García^b, Carlo Scapolla^c, Gianluca Damonte^c, Rosana Sanchez-Lopez^a, Alejandro Alagón^a, Roberto P. Stock^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^b Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Mexico

^c Department of Experimental Medicine, Biochemistry section, clo Center of Excellence for Biomedical Research-Viale Benedetto XV, 7-16132 Genova, Italy

Received 1 November 2004; received in revised form 4 December 2004; accepted 10 December 2004

Abstract

The Sec61 α protein is defined as a highly conserved essential integral component of the endoplasmic reticulum in eukaryotic cells. We report a detailed immunolocalization of the *Entamoeba histolytica* homologue of the Sec61 α subunit (*EhSec61 α*), which shows an irregular pattern throughout the cell and is also found on the cell surface, its effective down-regulation by means of antisense peptide nucleic acids and its effects on cell proliferation, subcellular distribution of two virulence factors, and the ability of the trophozoites to cause liver abscess in hamsters. Although Sec61 α levels are specifically decreased in antisense PNA-treated trophozoites, which proliferate more slowly than the controls, mobilization of the cysteine protease 5 and amoebapore to the cell surface is not significantly impeded and the capacity to induce liver abscess in hamsters is largely unaffected. The implications of these findings are discussed in the context of the peculiar cell biology of *E. histolytica*.

© 2005 Published by Elsevier Inc.

Index Descriptors and Abbreviations: *Entamoeba histolytica*; Endoplasmic reticulum; Sec61 α subunit; Abscess; Antisense peptide nucleic acid; CP5, cysteine protease 5; ER, endoplasmic reticulum; PNA, peptide nucleic acid

1. Introduction

The *Entamoeba histolytica* trophozoite, the etiologic agent of amebiasis in humans, is a motile, fluid, and actively phagocytic and secretory cell. One of the most salient characteristics of *E. histolytica* is the apparent lack of fixed structural compartments identifiable by microscopy. In fact, *E. histolytica* has often been described as devoid, among other things, of intracellular

compartments morphologically equivalent to the Endo- 39
plasmic Reticulum (ER) and Golgi system (Martínez- 40
Palomo, 1986), which are responsible for an important 41
part of post-translational modification and protein 42
traffic in model systems such as yeast and mammalian 43
cells. Although the *E. histolytica* cell is very atypical by 44
comparison to other eukaryotes, in the last few years 45
evidence, both biochemical and genetic, has been 46
accumulating which demonstrates the existence of 47
post-translational protein modification. Thus, some 48
enzymatic activities associated to post-translational 49
modification of proteins have been characterized (Var- 50
gas-Rodríguez, 1998; Villagómez-Castro et al., 1998), 51

* Corresponding author. Fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: rstock@ibt.unam.mx (R.P. Stock).

and an assortment of genes closely homologous to components of the secretory pathway of model eukaryotes have been cloned and sequenced (Gutiérrez et al., 2000; Juárez et al., 2001; Ramos and Alagón, 2000; Ramos et al., 1997; Saito-Nakano et al., 2000; Sánchez-López et al., 2000). Furthermore, a recent study established that Brefeldin A (BFA), which in other systems inhibits Golgi-dependent transport, partially affects adhesion of trophozoites to a fibronectin substrate as well as several exocytic and transport processes in vitro. The authors conclude that two mechanisms, one akin to the BFA-sensitive 'classical' vesicular transport and another alternate, inducible, BFA-insensitive system, coexist in *E. histolytica* (Manning-Cela et al., 2003). All these data contribute to a growing body of evidence available today which points to the existence of protein traffic and sorting systems functionally equivalent to those of other, better studied, eukaryotes. They also indicate that at least some important aspects of protein traffic and processing are likely to differ significantly from textbook model systems.

In an effort to understand the spatial organization of protein traffic in *E. histolytica*, our laboratory has, over the last few years, cloned and analyzed the intracellular distribution of several ER and Golgi marker genes highly homologous to those of model organisms. One such gene, reported by Sanchez-Lopez et al. (2000), is the homologue of the *SEC61* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, or Sec61 α in mammals, which codes for a key structural component of the translocation system known as the translocon, which has been the object of intense studies (reviewed in Eichler and Duong, 2004). Functional studies in this multiprotein system, in which Sec61 α is thought to conform an aqueous pore, suggest that it is responsible for the translocation of nascent proteins with signal peptides into the ER by a complicated series of interactions between the nascent peptide-mRNA-ribosome complex, the signal recognition particle (SRP) complex itself composed of several proteins and an RNA scaffold (Walter and Blobel, 1980; Walter and Johnson, 1994) and the translocon complex, which culminates with the cotranslational entry of the peptide into the lumen or the membrane of the ER, where it will be further modified and continue to subsequent destinations within the cell or be secreted. In *S. cerevisiae*, the *SEC61* gene is essential, presumably because its absence severely hampers protein traffic since the translocon is thought to be an obligatory early point of entry into the protein modification and sorting systems (Stirling et al., 1992).

In mammalian cells, a detailed study of cytolocalization of Sec61 α revealed that although most of the signal could be found in the perinuclear ER and ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC), as could be reasonably expected, a diffuse reticular labeling throughout the cells was also evident. The authors con-

cluded that Sec61 α is recycled from more distal compartments back into the ER-ERGIC although no known localization signals have been detected in Sec61 α (Greenfield and High, 1999). This study did not pursue the question of whether Sec61 α (and the other markers they examined) are functionally involved in protein translocation in these distal compartments, or whether they are part of non-functional structures awaiting recycling.

In the amitochondriate protozoan parasite *Giardia intestinalis* distinct compartments can be revealed by the use of ER molecular markers, both in proliferating as well as encysting *Giardia* trophozoites. A similar pattern, with strong perinuclear signals progressively weakening toward the cellular periphery could be observed (Marti et al., 2003a,b; Müller et al., 2003). Although the nature of the Golgi in this cell—in terms of its origin, structure and functionality in developmental stages—still remains the subject of debate, it is quite clear that an equivalent of the ER exists and can be defined spatially and functionally. In the intracellular Microsporidia, the eukaryote with the smallest genome, genes coding for two subunits of the Sec61 complex are found, pointing to the ubiquity and conservation of the *SEC61* gene group (Beznoussenko Mironov, 2002).

In cells in which a rough endoplasmic reticulum (RER) has been described, most notably higher animal cells, there is an evident spatial coupling of mRNA export and translation/translocation, as translation of the exported mRNA occurs at, or in the near vicinity of, the outer leaflet of the ER boundary, maximizing the probability of translocation of nascent peptides with appropriate signal sequences across the translocon of the ER-cytosol interface, and the initiation of their transit through the ER- and Golgi-dependent pathways. In the case of *Giardia*, the strong perinuclear labeling which fades toward the cellular periphery suggests a similar arrangement. Thus, reasonably fixed spatial relationships condition the functional relationships between successive compartments. In the case of *E. histolytica*, the equivalent of the RER and fixed compartments have not been described despite detailed electron microscopy studies, and whether they are altogether absent or their structure is very labile remains a very open question, and one that has important implications for the functionality of the secretory pathway in terms of the models that may be devised or used to understand it (Beznoussenko Mironov, 2002; Storrie and Nilsson, 2002) and to the life circumstances, the cellular physiology and pathogenic potential of *E. histolytica*.

Ulceration and destruction of host tissues, notably the colonic epithelium and the liver, resulting from infection by *E. histolytica* are thought to be the result of interactions between parasite factors and host factors. *E. histolytica* factors that influence the ability of the

164 trophozoite to invade and cause tissue damage include,
 165 among others, pore-forming peptides (amoebapore;
 166 Leippe, 1997), a galactose *N*-acetylgalactosamine (Gal-
 167 GalNAc)-specific lectin (Petri et al., 2002) and a family
 168 of at least seven cysteine proteases (Que and Reed,
 169 1997). Although the mechanism of invasion is far from
 170 being understood, several studies, particularly those
 171 using antisense methodologies, suggest that these factors
 172 are implicated (reviewed in Bracha et al., 2003; Petri and
 173 Ramakrishnan, 1999). Therefore, the invasion process
 174 must perforce be linked to the protein processing and
 175 traffic systems of the *E. histolytica* trophozoite, as some
 176 factors are post-translationally modified (such as the
 177 Gal-GalNAc lectin, which is glycosylated) and localized
 178 to the cell membrane (the Gal-Gal-NAc lectin and the
 179 cysteine protease 5, CP5), and some are localized to the
 180 cell membrane and actively secreted (amoebapores). A
 181 non-pathogenic close relative of *E. histolytica*, *Ent-*
 182 *amoeba dispar*, does not cause disease, but not all *E. his-*
 183 *tolytica* (sensu stricto) infections culminate in invasion,
 184 which has led to the proposal that there are strains of
 185 variable pathogenic potential in a complex interplay
 186 with host factors, which are of course harder to define,
 187 and which possibly include genetic (such mucin gene
 188 alleles, immune determinants) as well as environmental
 189 components of importance (i.e., diet, specific intestinal
 190 flora; Campbell and Chadee, 1997).

191 We performed a detailed immunolocalization of
 192 Sec61 α subunit in the *E. histolytica* trophozoite, and
 193 decided to study some of the effects of its down-regula-
 194 tion under the working hypothesis that its role should be
 195 similar to the one described in model systems. That is,
 196 that it constitutes a common denominator for post-
 197 translational processing and traffic of many components
 198 of the trophozoite, presumably including some virulence
 199 factors, and that it may possibly be an essential gene as
 200 in yeast. As a tool for down-regulation of the gene we
 201 decided to use an antisense PNA 17-mer complementary
 202 to the Sec61 α subunit mRNA. We have previously
 203 shown that unmodified PNA oligomers are taken up by
 204 *E. histolytica* trophozoites and are effective and specific
 205 antisense down-regulators of protein translation in this
 206 parasite (Stock et al., 2001). We followed some of the
 207 effects of lowering the steady-state level of Sec61 on the
 208 viability and proliferation of trophozoites, the distribu-
 209 tion of the CP5 protein and of amoebapore on the sur-
 210 face of the cell, and the virulence of the trophozoites in
 211 terms of liver abscess formation in hamsters following
 212 intraportal injection of trophozoites. We discuss some
 213 implications of the structure of the compartments visual-
 214 ized by the observed distribution of the Sec61 α subunit
 215 and other markers in *E. histolytica* trophozoites, and
 216 their possible relation to other characteristics of this very
 217 unusual cell which may impinge on the structural
 218 requirements and constraints of its post-translational
 219 and protein targeting systems.

2. Materials and methods

220

221

2.1. Cells and cultures

222

223

The *E. histolytica* strain HM-1:IMSS was used
 throughout this study. It was cultured anaerobically in
 TYS-33 medium as previously described (Diamond
 et al., 1978).

224

225

226

227

228

2.2. PNA synthesis and characterization

229

230

An antisense PNA 17-mer was synthesized which is
 complementary to the first 17 nucleotides (5'-AUG
 GGAGUGUUUUCAA-3') of the coding sequence of
E. histolytica Sec61 α subunit gene (*Eh* Sec61, GenBank
 Accession No. AY730760) by manual solid-phase syn-
 thesis using commercial PNA monomers (PerSeptive
 Biosystems) and published protocols (Egholm et al.,
 1993). A control PNA of the same length and base com-
 position but of scrambled sequence was also synthesized
 and used as control. All PNAs were purified by reverse-
 phase HPLC, using a C₁₈ column and acetonitrile gradi-
 ents, to greater than 95% purity and their molecular
 masses determined by electrospray ionization mass spec-
 trometry (ESI-MS). The two PNA oligomers used in this
 study were: antisense NH₂-TTGAAAAACACTCC
 CAT-CONH₂ and scrambled NH₂-ATATAGACAC
 ACTTACC-CONH₂. According to convention, the
 amino-terminus of the PNA analog is considered equiv-
 alent to the 5' of oligonucleotides, and thus they were
 designed for antiparallel hybridization (carboxyl termi-
 nus of the PNA apposed to the 5' of the coding
 sequence). Although antisense PNA design remains
 largely empirical, in our hands 17-mer PNAs directed
 against the initial coding nucleotides of *E. histolytica*
 genes have been effective antisense down-regulators of
 expression in five out of six cases. A useful systematic
 study of antisense PNA design for mammalian cells is
 that of Doyle et al. (2001).

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

2.3. Antibodies to Sec61

260

261

The specific antibodies used in this study were those
 reported by Sanchez-Lopez et al. (2000). The antibodies
 were obtained by immunization with the carboxy-termi-
 nus of heterologously expressed *E. histolytica* Sec61 α
 subunit, affinity-purified against the recombinant immu-
 nogen and detect a single band of the expected molecu-
 lar mass in western blots of whole *E. histolytica*
 trophozoite lysates.

262

263

264

265

266

267

268

269

270

2.4. Antibodies to virulence factors

271

272

Specific rabbit antibodies against CP5 were obtained
 by immunization of NZW rabbits using the synthetic
 peptide NH₂-CETCTYDKKKVAV-CONH₂ (described

273

274

275

by Jacobs et al., 1998) conjugated to bovine serum albumin via the terminal Cys residue. These in turn were affinity purified using the peptide coupled to CNBr-activated Sepharose beads by standard procedures. Affinity-purified antibodies to amoebapore were obtained in rabbits immunized with pure active amoebapore of pathogenic *E. histolytica* HM-1:IMSS trophozoites (Leippe et al., 1991; Loew et al., 1983; Pick, 1981) and were a kind gift of the group of Dr. Ruy Pérez-Tamayo.

2.5. Fluorescence microscopy

Cells adhered to glass coverslips overnight (in culture medium) in an anaerobic chamber were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 37°C, washed four times with phosphate buffered saline (PBS), permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Kodak) in PBS, and blocked with 5% non-fat milk (Nestlé, Vevey, Switzerland) in PBS for 1 h at 37°C. The specific antibodies against Sec61 α subunit (at 5 μ g/ml) were added to the fixed, permeabilized and blocked cells and incubated at room temperature for 1 h. After extensive washing, a goat anti-rabbit-Alexa 488 conjugate (at 1 μ g/ml, Molecular Probes, Eugene, Oregon) was added and incubated at room temperature for 1 h. Cells were washed extensively and, in the Sec61 localization studies with permeabilized cells, they were counterstained with 2 μ g/ml propidium iodide (Molecular Probes) in PBS after RNase treatment for 30 min (100 μ g/ml). In the case of non-permeabilized cells, the Triton X-100, RNase and counterstaining steps were omitted and blocking of residual reactive sites of the fixative was done for 30 min in 50 mM NH₄Cl in PBS pH 7.4. Samples were mounted in ProLong antifade/mounting medium (Molecular Probes) or Vectashield (Vecta Laboratories) and observed either in a Bio-Rad MRC600 system fitted to a Zeiss Axioskop or a Zeiss 510 Meta mounted on a Zeiss Axiovert. Optical slices were collected using the available fluorescence channels and appropriate dichroic/filter combinations under fully confocal conditions. When indicated, slices are projected with the maximum-intensity algorithm. Controls with secondary antibodies showed no signal at the gain and laser power settings used.

2.6. Digital microcinematography

HM-1:IMSS trophozoites in PBS were photographed every 500 ms (2 frames per second) in a Nikon E600 microscope with a 60 \times DIC objective (and appropriate prisms/polarizers) using a CoolSnap_{HQ} CCD camera (Roper Scientific) controlled by IPLab software (v. 3.6, Scanalytics, Fairfax, USA). In the Quicktime movie frames are played at 10 fps (so movement is accelerated five times with respect to the original time series). Stage displacement in the x-y axes to follow the trophozoite was done manually.

2.7. Antisense inhibition of *EhSec61* expression and Western blot

PNAs were used from 1 mM stocks in water. Identical cultures of exponentially growing trophozoites in growth medium were exposed to 20 μ M of the antisense PNA or the scrambled PNA for 96 h. Otherwise identical control cultures without PNA were always included. Expression of Sec61 α was measured by normalized quantitative Western blot of trophozoite lysates (Stock et al., 2001). Briefly, after 96 h of incubation with antisense or scrambled PNA of identical trophozoite cultures, trophozoites were harvested, washed, counted, resuspended at 2 \times 10⁶ cells/ml in PBS, lysed in SDS-PAGE sample buffer with 0.5 mM E-64 (Sigma) and 25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and the protein concentration determined (BCA method, Pierce Chemical, Rockford, IL) and normalized for all samples. Identical amounts of lysate protein in identical volumes were loaded onto 15% SDS-PAGE gels, separated electrophoretically, and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked, incubated with the affinity-purified anti-Sec61 α rabbit antibody (at 1 μ g/ml), and developed with a goat-anti-rabbit-alkaline phosphatase antibody conjugate (Zymed, San Francisco, USA) and BCIP/NBT (Zymed). Densitometry was done using the NIH Image 1.62 software package. Results are plotted as percentage inhibition with respect to untreated control levels \pm SD of triplicate determinations.

2.8. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

For flow cytometric studies, identical inoculi of 10,000 cells in 5 ml of growth medium were incubated with the antisense and scrambled PNA at 20 μ M as described above. The cells were collected at 96 h by centrifugation, fixed in suspension with 4% paraformaldehyde for 30 min at 37°C, washed extensively, and blocked for 1 h at 37°C in 50 mM NH₄Cl. Staining with rabbit anti-CP5 or anti-amoebapore at 10 μ g/ml was done for 1 h, the cells were extensively washed and incubated for 1 h with 1 μ g/ml of the secondary antibody (goat-anti-rabbit Alexa 488 conjugate, Molecular Probes), washed, resuspended in 1 ml PBS, and analyzed in a Becton-Dickinson FACS system using the CellQuest software and appropriate settings for power, gain and gating. 10,000 events were counted for analysis of each sample. A sample of cells stained with the fluorescent antibody conjugate only were included as controls.

2.9. Induction of amoebic liver abscess in hamsters

Four hundred grams hamsters were used for each experimental group. Anesthetized animals were injected intraperitoneally with 1 \times 10⁶ viable HM-1:IMSS trophozoites as previously described (Olivos-García et al., 2004). For each experiment, three groups corresponding to

hamsters injected with untreated (control) trophozoites, scrambled PNA-treated and antisense PNA-treated trophozoites (with 20 μ M of the corresponding PNA for 96 h prior to injection). Two different experiments were conducted: in the first, PNA-treated and control trophozoites were injected and the hamsters were sacrificed 1 week later, the livers dissected, weighed, and tissue sections were prepared for histochemical staining. In the second experiment, hamsters equally injected were given a boost of PNA (1.5 mg/kg) intraperitoneally every day until they were sacrificed as above. The results were essentially the same for both experiment types. All experiments were conducted at appropriately certified animal facilities.

3. Results

3.1. Intracellular distribution of Sec61

The intracellular distribution of Sec61 α is shown in Fig. 1. In non-permeabilized cells (Fig. 1A), Sec61 α was detected at the cell surface. In permeabilized cells (Fig. 1B), signal is apparent throughout most of the cellular volume, with some exclusion from the forming pseudopods (arrows), including a perinuclear staining which we found to be very reproducible and is similar, although quantitatively less important, to that of mammalian cells and *Giardia*. However, most of the signal is distributed far from the nucleus or nuclei. This pattern, although more detailed, is consistent with those reported by other groups for other markers of the ER in *E. histolytica* (see

Section 4). It is difficult, at this level of resolution, to ascertain continuity in the apparently elongated structures revealed in some cells by Sec61 antibodies, particularly in those strongly adhered and crawling, but if the structures are continuous (i.e., tubular), structures of that size have not been clearly identified in the numerous electron microscopic studies. We think that, possibly, they are more a consequence of cytoplasmic flow along the axis of displacement of the trophozoites than physically continuous structures. To illustrate this, we show a typical time-resolved microscopy of live *E. histolytica* HM-1:IMSS trophozoites in motion, in which the contents of the granular cytosol, including the nucleus or nuclei, can be seen as relatively free and changing relative positions as the cell deforms and moves (the movie can be viewed and/or downloaded at www.ibt.unam.mx/flow).

An interesting feature of Sec61 α subunit staining was that small and variable amounts of signal were detected within the nuclei, but mostly excluded from the DNA signal generated by propidium iodide counterstaining. The existence of this physical continuity between the nucleus and the ER in terms of molecular markers has been described in many organisms, including *Giardia*, and it may provide a physical coupling between transcription, mRNA export, and translation/translocation into the ER and the secretory pathway (see Section 4).

3.2. Inhibition of Sec61 expression

Antisense inhibition of Sec61 α expression, measured by quantitative western blot, was apparent after 72 h and

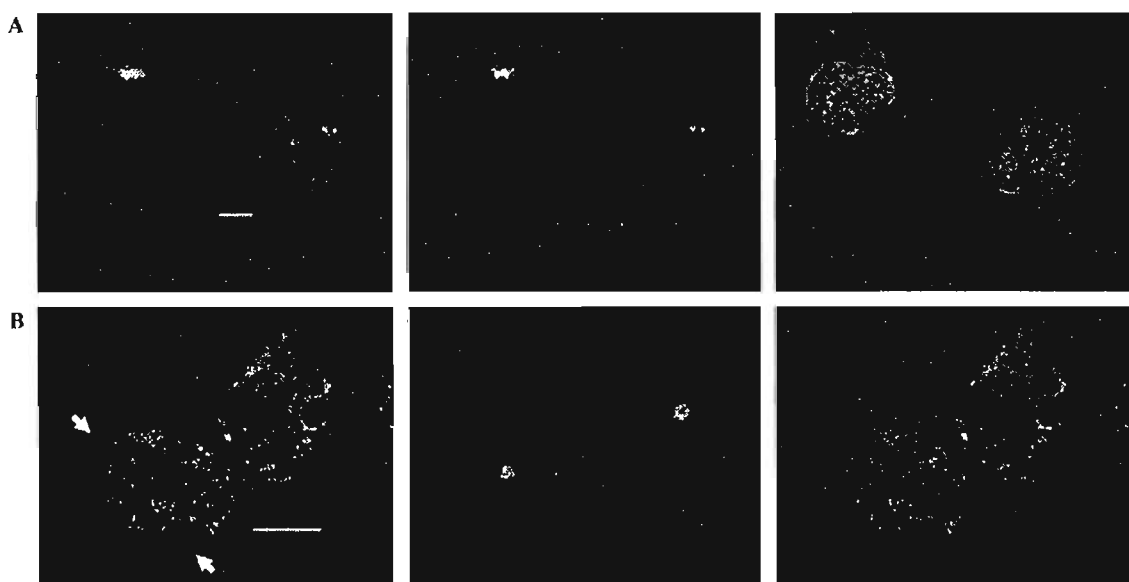


Fig. 1. Subcellular localization of the Sec61 α subunit in *E. histolytica* trophozoites. (A) Non-permeabilized cells. Left (40 \times objective), maximum intensity projection of complete confocal dataset of non-permeabilized cells; middle, single equatorial optical slice; right, phase contrast of the same field. Note the clear surface distribution of Sec61. (B) Triton X-100-permeabilized cells. Left (100 \times objective), maximum intensity projection of four equatorial slices of permeabilized cells, arrows indicate pseudopodial extensions; middle, same projection of propidium iodide counterstain (nuclei); right, superimposed images. Bars are 10 μ m.

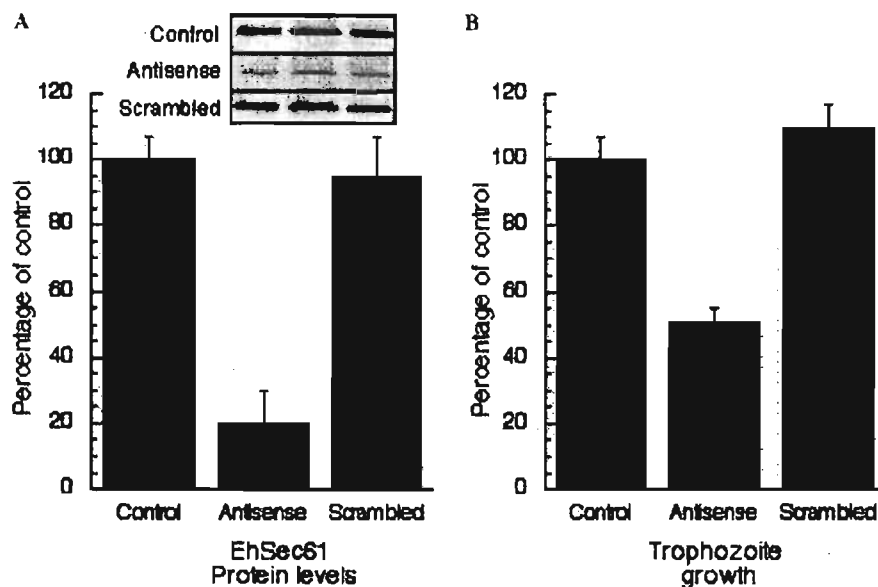


Fig. 2. Down-regulation of Sec61 α expression by antisense PNA in trophozoites and effect on cell proliferation. (A) Steady-state levels of Sec61 α after 96 h of PNA treatment, expressed as percentage of untreated control, by Western blot (top inset). (B) Proliferation of trophozoites after 96 h of treatment with antisense and scrambled PNAs against Sec61 expressed as percentage of untreated control.

maximal at 96 h of exposure of trophozoites to 20 μ M antisense PNA, while not observed in scrambled PNA-treated cultures, which behaved essentially as the untreated controls both in terms of Sec61 levels and proliferation (Figs. 2A and B, respectively). The decrease in Sec61 α levels was correlated with a decrease in proliferation which did not affect the viability of the trophozoites, which was always above 90%, as evidenced by Trypan blue exclusion.

3.3. Distribution of CP5 and amoebapore

The distribution of the cysteine protease 5 (CP5) and amoebapore were studied in non-permeabilized cells to analyze the membrane distribution (since most of this signal is lost upon permeabilization with Triton X-100). In confocal optical sections shown in Fig. 3, the arrival at the cell surface of CP5 (Fig. 3A) or amoebapore (Fig. 3B) did not seem to be significantly affected by treatment with antisense PNA. Since microscopy allows observation of only very gross changes in the levels of the molecules studied at the surface of only a few cells, we performed a flow cytometric analysis to measure the levels of CP5 and amoebapore at the cell surface in a large population of treated and control trophozoites, shown in Fig. 4. CP5 levels at the surface of the cells were not significantly altered (left panel), in accordance to the microscopic observations. Interestingly, in the case of amoebapore (right panel) the flow cytometric analysis of non-permeabilized trophozoites indicated that surface levels were increased, specifically, by antisense PNA treatment (see Section 4).

3.4. Effect of antisense PNA treatment of trophozoites on liver abscess formation in hamsters

Intraportal injection of identical quantities of viable untreated (control), and scrambled- and antisense PNA-treated trophozoites resulted in extensive ulceration of liver in most animals within each group. Two types of experiments were performed with equivalent results: In the first, trophozoites were treated with antisense or scrambled PNA for 96 h, washed, counted and injected; in the second, the hamsters were additionally given intraperitoneal doses of 1.5 mg/kg of PNA every day after trophozoite injection until sacrificed for liver examination. As liver abscess results in an increase in liver mass, the weight of the livers is a measure of the extent of damage, we show in Table 1 their weights and average for each group. Despite the apparent, and well known, individual variation, no statistically significant inhibition of liver damage could be observed upon antisense PNA treatment of the trophozoites, which is consistent with the observation that CP5 and amoebapore arrival at the cell surface did not seem negatively affected by the lowered Sec61 α levels, and although proliferation of antisense PNA-treated trophozoites (before the intraportal injection) was 40% of the untreated control cultures.

4. Discussion

4.1. Intracellular distribution of Sec61 α in trophozoites

The *E. histolytica* trophozoite is extremely fluid, and under the optical microscope the cytosol of the moving

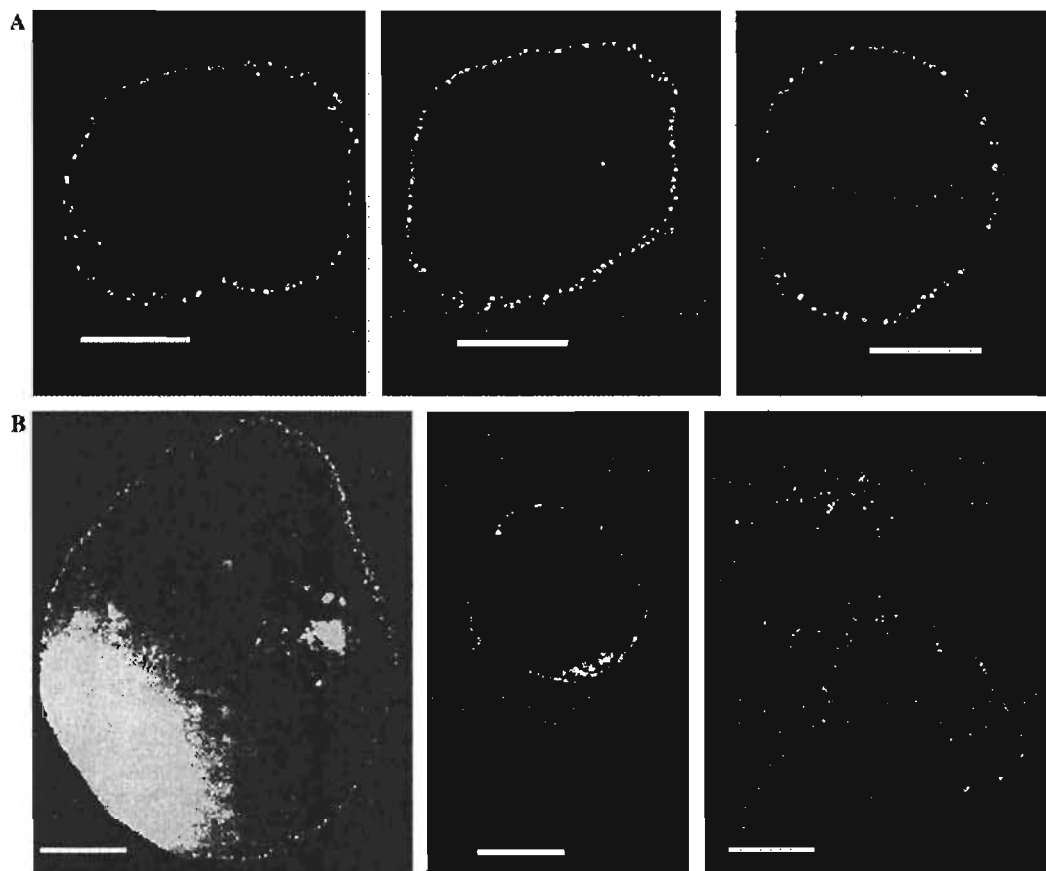


Fig. 3. Immunolocalization of CP5 (A) and amoebapore (B) in non-permeabilized PNA-treated and untreated trophozoites at 96 h. Representative equatorial confocal slices. Top left panel, untreated control; top middle, antisense-treated; top right, scrambled PNA-treated. Bottom left panel, untreated control; bottom middle, antisense-treated; bottom right, scrambled PNA-treated. Bars are 10 μ m.

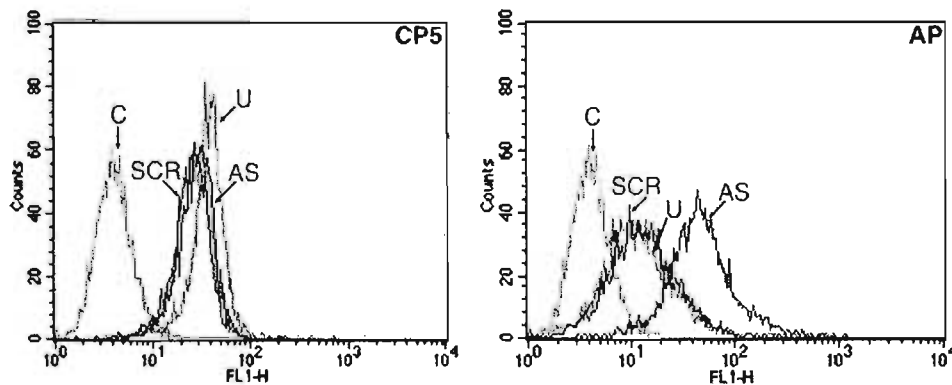


Fig. 4. Flow cytometric analysis of cysteine protease 5 (CP5, left) and amoebapore (AP, right) in untreated (U), antisense PNA-treated (AS) and scrambled PNA-treated (SCR) trophozoites. Note the increase in surface-bound amoebapore in the antisense-PNA treated cultures. 10,000 cells were counted per sample. Control cells with secondary antibody only (C).

trophozoite can be divided into two distinct regions: the granular cytosol where the abundant vesicles, vacuoles and the nucleus (or nuclei) are seen, and the hyaloplasmic cytosol which corresponds to the cell periphery and pseudopodial extensions, highly dynamic but largely devoid of discernible compartments. As shown in the accompanying time-resolved microscopy of live tropho-

zoites in motion, the organellar contents of the granular cytosol, including the nucleus or nuclei, can be seen as relatively free and changing relative positions as the cell deforms and moves. Sec61 α was found to be distributed within the greater part of the volume of the trophozoites. and the distribution was quite variable between trophozoites. A significant portion of the signal could be

512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567

668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723

Table 1
Weight of individual dissected hamster livers after a week of intraportal injection of PNA-treated trophozoites and controls, and averages \pm standard deviation for each group

Treatment	Weight of liver (g)		
	Control	Scrambled PNA	Antisense PNA
<i>No PNA boost</i>			
Hamster 1	10.0	6.1	6.6
Hamster 2	10.3	5.4	4.9
Hamster 3	5.8	7.7	7.0
Hamster 4	6.0	15.9	8.3
Average \pm SD	8.0 \pm 2.5	8.8 \pm 4.8	6.7 \pm 1.4
<i>Daily PNA boost</i>			
Hamster 1	7.2	6.9	8.5
Hamster 2	11.4	14.3	7.5
Hamster 3	6.3	8.5	5.3
Hamster 4	8.9	6.0	6.3
Average \pm SD	8.5 \pm 2.2	8.9 \pm 3.7	6.9 \pm 1.4

detected on the surface of the cells, as evidenced by immunocytochemistry of non-permeabilized trophozoites. The distribution of the Sec61 α signal was neither homogeneous nor reproducibly clustered, and aggregates and seemingly elongated structures of various sizes could be easily observed inside the cells, mostly restricted to the granular portion of the cytosol. This staining pattern was consistent with that of other markers tested with specific antibodies from our laboratory, such as the one for a homologue of a protein disulphide isomerase (PDI, an ER marker, Manning-Cela et al., 2003), Erd2 (a Golgi-ERGIC marker, Manning-Cela et al., 2003), and a component of the oligosaccharyl-transferase complex (*Eh* stt3, itself described as a membrane-bound component of the ER by Gutiérrez et al., 2000, data not shown). In summary, all ER and Golgi markers studied to date, by us and others, show very diffuse patterns and no outward clear gradients from the nucleus (or nuclei) to the cell periphery.

The distributed and variable pattern observed suggests that cell deformation necessary for amoeboid motion impinges on the distribution of the compartments defined by Sec61 α . This stands in sharp contrast to many of the cells in which cytolocalization of ER components have been performed, which are rigidly structured cells (i.e., HeLa or yeast), and where ER detection shows stable perinuclear staining which comprises most of the signal. In the case of the amitochondriate *G. intestinalis*, which exhibits many similarities to *Entamoeba*, cell morphology is considerably more restricted in terms of both shape (simple bilateral symmetry), size and number of nuclei. Although *Giardia* represents an excellent model of a hypothetically ancestral secretory pathway, functional relationships between compartments still require much research. As a very recent review on the subject reports, "...the molecular machinery in *Giardia* appears to be similar to that in

higher cells, but less complex at a molecular level and clearly different in its organization." (Hehl and Marti, 2004). However, at the cellular level, the *E. histolytica* trophozoite is in many aspects even more rudimentary and heterogeneous than its *Giardia* equivalent and this seems to be reflected in the subcellular distribution of ER markers.

Particularly interesting in this context is the abundance of Sec61 α signal at the cell surface of the *E. histolytica* trophozoite. Whether its role is that presumed for Sec61 α in mammalian cells, that is, structures awaiting recycling (or possible secretion or shedding?), or whether some protein translocation or other ER-type function occurs at the cell periphery/surface, remains a matter to explore in the future. The small and variable amounts of Sec61 which was associated to the nuclei could indeed physically couple mRNA export with translation/translocation, but if this were the case it would only be a minor part of the Sec61 α which would be "operational" in any particular time, and its colocalization with that of the translation machinery and SRP would have to be established.

In *E. histolytica*, the extent to which the persistent cellular deformation, with its concomitant flow of cellular contents and change in relative position of the different subcellular compartments affects the vectoriality and kinetics of protein traffic is an important issue for future research, and it is likely that its study will expand the present models of directional protein modification and sorting which presently hardly address these questions.

4.2. Inhibition by antisense PNA of Sec61 expression

Inhibition of Sec61 α expression in trophozoites resulted in a decreased proliferative capacity of the cells in culture, although no cytotoxic effects could be observed, as even after 96 h of treatment, and with Sec61 levels around 30% of those of the untreated controls. Viability was always above 90%. Down-regulation of Sec61 α expression and its concomitant effect on proliferation were specific, as they were not observed in the cultures treated with the scrambled PNA which behaved essentially as the untreated control. The effect on proliferation and protein levels was also dose-dependent (data not shown), as we had observed upon PNA-mediated antisense down-regulation of the ERGIC-Golgi marker gene Erd2 (Stock et al., 2001), also described as an essential gene in yeast. The effect is also unlikely to be the result of non-specific interactions between the PNA and the trophozoite, as in experiments using PNA to down-regulate another gene homologue of later stages of the secretory pathway, *Eh*Rab8, we observed a specific inhibition of expression of around 80% but no decrease in proliferation, and with yet another PNA directed against the Rab8 5' untranslated region, we saw no inhibition of

836 expression and no decrease in proliferation (data not
837 shown). A recent report of *E. histolytica* γ -tubulin gene
838 silencing by double-stranded RNA (Vayssié et al., 2004)
839 showed a decrease in expression of around 60%, quite
840 comparable to the levels of inhibition attained with anti-
841 sense PNA reported here and previously (Stock et al.,
842 2001).

844 4.3. Distribution of CP5 and amoebapore

845 The distribution of CP5 was examined by microscopy
846 in control and PNA-treated cultures. As permeabiliza-
847 tion removes the greater part of the CP5 signal from the
848 cell surface, non-permeabilized cells were observed. The
849 membrane distribution of CP5 is largely unaffected by
850 the decreased level of Sec61 α . These results were con-
851 firmed by flow cytometric analysis, in which variation in
852 large populations of cells can be quantitatively studied.
853 Interestingly, although CP5 levels were mostly
854 unaffected by antisense PNA treatment, amoebapore
855 levels were significantly and specifically increased in the
856 antisense PNA-treated cultures, suggesting that alterna-
857 tive pathways may be at work and may be activated by
858 various stimuli and, possibly, when Sec61 levels are low-
859 ered since the scrambled PNA-treated trophozoites
860 exhibited a distribution of amoebapore essentially iden-
861 tical to that of the control cultures. In accordance with
862 conclusions of Manning-Cela's study (2003), these alter-
863 native pathways may not be constitutive and may affect
864 some cellular processes specifically: in this case, amoeba-
865 pore but not CP5 transport to the cell surface.

867 In *G. intestinalis*, a recent genome-scale study demon-
868 strated that very few (if any) genes associated to protein
869 processing and transport were differentially expressed in
870 a stage-specific manner, suggesting that although gross
871 morphological changes are observed during encystation,
872 these are not the consequence of newly or differentially
873 expressed genes but rather rearrangements of previous
874 components into new compartment configurations
875 (Marti et al., 2003b). As pointed out by the authors, this
876 stands in sharp contrast to, for example, trypanosomes,
877 in which stage-specific regulation of secretory pathway
878 genes is clearly demonstrable. If this, or a similar case,
879 were true in *E. histolytica*, it may be reflected in trans-
880 port systems of singular robustness, capable of tolerat-
881 ing significant variations in the levels of key gene
882 products such as, possibly, the Sec61 α subunit, particu-
883 larly in asynchronous cultures.

885 4.4. Induction of liver abscess

887 The objective of this study was to carry out a multi-
888 level study of the effect of down-regulation of the Sec61 α
889 component of the ER, described as essential in the initia-
890 tion of protein traffic. After studying its distribution in
891 the cell and various aspects of the response to antisense

892 PNA in vitro, a series of experiments in vivo were the
893 logical next step. However, down-regulation of Sec61 α
894 expression did not significantly reduce the capacity to
895 induce, nor the average extension of, liver abscess in
896 intraperitoneally injected hamsters. This result was surpris-
897 ing, and although the virulence factors (CP5 and
898 amoebapore) whose distribution we studied do not
899 comprise a complete catalog of virulence determinants,
900 we did expect some diminished pathogenic capacity of
901 the slowly proliferating antisense PNA-treated tropho-
902 zoites.

904 4.5. Concluding remarks

905 In virulent *E. histolytica* trophozoites, a significant
906 decrease in steady-state levels of Sec61 α , while slowing
907 down cell proliferation in vitro, was not significantly
908 reflected neither in transport of CP5 and amoebapore to
909 the cell surface nor in their capacity to induce liver
910 abscess in vivo. These findings can be interpreted in at
911 least three ways: (1) Assuming an equivalent role for
912 Sec61 α in *E. histolytica* to that in yeast or mammalian
913 cells, the secretory pathway initiating with cytosol-to-
914 ER translocation via the Sec61-translocon is operating
915 largely below saturation, thus not being affected by the
916 decrease of over 70% of Sec61 α . This could be inter-
917 preted as a non-linear dependence of the phenotype
918 (CP5 and amoebapore transport to the cell surface and
919 induction of tissue damage) on Sec61 levels, with a seg-
920 ment ranging from 100% (normal level) to about 30% of
921 normal in which Sec61 levels do not affect the various
922 aspects of the phenotype we examined, save duplication
923 time in vitro. In *S. cerevisiae*, the *SEC61* gene is essential,
924 and although to our knowledge no reports exist on the
925 tolerance to the effects of down-regulation, its deletion is
926 lethal for the cell. In *E. histolytica*, deletion of the
927 *EhSec61 α* gene is not possible yet, but it remains a possi-
928 bility that a complete absence of the *EhSec61 α* gene
929 product will compromise cellular survival in culture or
930 in vivo, as it does in yeast, or that stronger suppression
931 than the one we achieved possibly by transcriptional
932 silencing, as reported for amoebapore (Bracha et al.,
933 2003)—will be reflected phenotypically in terms of pro-
934 tein mobilization and/or pathogenicity; (2) It is also pos-
935 sible that *E. histolytica* relies less on the Sec61—
936 translocon for initiation of transport via de secretory
937 pathway than model systems—while preserving a “clas-
938 sical” vesicular transport overall scheme—and that
939 alternative, and yet to be characterized, routes have
940 greater relative contributions to protein traffic, equiva-
941 lent to the non-SRP-dependent translocation described
942 in yeast. Indirect support for this is provided by the
943 highly disperse and irregular staining pattern of Sec61 α
944 and other ER and Golgi markers, as well as the high
945 fluidity and variable spatial relationships between intra-
946 cellular structures stained by the anti-Sec61 antibodies 947

and its localization at the cell surface. More functional studies on the particular roles of gene products of homologues of the secretory pathway will be needed to clarify this issue; (3) Finally, it is also conceivable that the secretory pathway of *E. histolytica* is itself very different structurally and kinetically than that of the better known models, and although the homologous genetic units exist (such as *EhSec61 α* and others), their activities and functions may be substantially different than in other cell types. This situation has a parallel in the existence of mitochondrial gene homologues in *E. histolytica* (and other amitochondriate parasites) although a *bona fide* functional mitochondrion does not exist in this cell (Tovar et al., 1999).

This last theoretical possibility is, in many ways, better suited for addressing several fundamental differences between the *E. histolytica* cell and model eukaryotic cells which are likely to affect the structure and dynamics of protein sorting. One significant difference is the absence of a demonstrable microtubular network which in model eukaryotic cells provide both a structural scaffold and vectoriality to vesicular transport, which is massively and reversibly compromised, as many other cellular subsystems, by microtubule depolymerizing drugs such as nocodazole and colchicin. In fact, *E. histolytica* tubulin genes are possibly the most divergent of all eukaryotes (Edlind et al., 1996; Sanchez et al., 1994), and their functionality is still to be established as a microtubular network has only been identified in the nucleus (Vayssié et al., 2004), and would not be expected to be relevant to cytoplasmic vesicular traffic.

Another important difference that will have to be taken into account in studies of protein modification and traffic in *E. histolytica*, besides that of its morphological fluidity, is the relationship between its very unusual cell cycle and the structure of compartments such as the ER and Golgi. It has been reported, and is a well known fact to researchers who culture *E. histolytica*, that nuclear and cellular division (karyo- and cytokinesis) are not linked in this cell type, resulting in cultures which are mixed populations of mono-, bi- and even polynucleated cells, even if they are clonal (Das and Lohia, 2002; Lohia, 2003). Additionally, it is well-known and abundantly documented, that in mammalian and yeast cells the structure of the secretory pathway is linked to the cell cycle, and that mitosis entails massive dissolution and restructuration of secretory compartments which spontaneously self-organize and re-form in the daughter cells. In this light, if nuclear and cellular division are uncoupled it should be most instructive to explore what kind of a secretory pathway may adapt to the needs of a cell with different amounts of (asynchronously dividing) nuclei, very variable size (often related to the number of nuclei) and shape, very underdeveloped (if present) cytoplasmic microtubular network, and high flow of intracellular compartments.

5. Uncited reference

Olivos-García et al. (2003).

Acknowledgments

We wish to thank Augusto González-Canto for the antibody to amoebapore. We wish also to acknowledge the excellent support of the the staff of the Instituto de Biotecnología's animal and computer facilities, as well as that of Olegaria Benitez for the culture of *E. histolytica*. This work was supported in part by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) Grant 33079-N and DGAPA Grants 208400 and IN-225998. All experiments were conducted according to the directions of the General Health Law of Mexico.

References

- Bezoussenko, G.V., Mironov, A.A., 2002. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *Anatomical Record* 268, 226–238.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Mirelman, D., 2003. Transcriptional silencing of an Amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 2, 295–305.
- Campbell, D., Chadee, K., 1997. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune response. *Parasitology Today* 13, 184–189.
- Das, S., Lohia, A., 2002. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cellular Microbiology* 4, 55–60.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C., 1978. A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 413–432.
- Doyle, D.F., Braasch, D.A., Simmons, C.G., Janowski, B.A., Orey, D.R., 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.
- Edlind, T.D., Li, J., Visvesvara, G.S., Vodkin, M.H., McLaughlin, G.L., Katiyar, S.K., 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5, 359–367.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B., Nielsen, P.E., 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen bonding rules. *Nature* 365, 556–568.
- Eichler, J., Duong, F., 2004. Break on through to the other side—the Sec translocon. *Trends in Biochemical Sciences* 29, 221–223.
- Greenfield, J.A., High, S., 1999. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *Journal of Cell Science* 112, 1477–1486.
- Gutiérrez, A., Sánchez-López, R., Ramos, M.A., Alagón, A., 2000. Cloning of the *Entamoeba histolytica* SIT3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Archives of Medical Research* 31, S162–S164.
- Hehl, A.B., Marti, M., 2004. Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Molecular Microbiology* 53, 19–28.
- Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E., Leippe, M., 1998. Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 27, 269–276.

- Juárez, P., Sanchez-Lopez, R., Stock, R.P., Olvera, A., Ramos, M.A., Alagón, A., 2001. Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116, 223–228.
- Leippe, M., 1997. Amoebapores. *Parasitology Today* 13, 178–183.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., Muller-Eberhard, H.J., 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7659–7663.
- Locw, L.M., Rosenberg, I., Bridge, M., Gitler, C., 1983. Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry* 22, 837–844.
- Lohia, A., 2003. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253, 217–222.
- Manning-Cela, R., Marquez, C., Franco, E., Talamás-Rohana, P., Meza, I., 2003. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to pathogenesis. *Cellular Microbiology* 5, 921–932.
- Marti, M., Li, Y., Schraner, E.M., Wild, P., Köhler, P., Hehl, A.B., 2003a. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. *Molecular Biology of the Cell* 14, 1433–1447.
- Marti, M., Regós, A., Li, Y., Schraner, E.M., Wild, P., Müller, N., Knopf, L.G., Hehl, A.B., 2003b. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24837–24848.
- Martinez-Palomo, A., 1986. *Biology of Entamoeba histolytica*. In: Martinez-Palomo, A. (Ed.), *Amebiasis*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 11–43.
- Olivos-García, A., Nequiz-Avendaño, M., Tello, E., Martínez, R.D., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., 2004. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. *Experimental and Molecular Pathology* 77, 66–71.
- Olivos-García, A., González-Canto, A., López-Vancell, R., García de León, M.C., Tello, E., Nequiz-Avendaño, M., Montfort, I., Pérez-Tamayo, R., et al., 2003. Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amoebic liver abscess in hamsters. *Parasitology Research* 90, 212–220.
- Petri Jr., W.A., Ramakrishnan, G., 1999. Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Trends in Microbiology* 7, 471–473.
- Petri Jr., W.A., Haque, R., Mann, B.J., 2002. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annual Reviews of Microbiology* 56, 39–64.
- Pick, U., 1981. Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 212, 186–194.
- Que, X., Reed, S.L., 1997. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitology Today* 13, 190–194.
- Ramos, M.A., Alagón, A., 2000. Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 31, S173–S175.
- Ramos, M.A., Mercado, G.C., Salgado, L.M., Sánchez-López, R., Stock, R.P., Lizardi, P.M., Alagón, A., 1997. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 KDa subunit of the signal recognition particle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88, 225–235.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T., 2000. Identification and characterization of a Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 31, S155–S156.
- Sanchez, M.A., Peattie, D.A., Wirth, D., Orozco, E., 1994. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* alpha-tubulin-encoding gene. *Gene* 146, 239–244.
- Sanchez-Lopez, R., Siminovich, B., Alagón, A., 2000. *Entamoeba histolytica* codes for a protein homologue of the Sec61 alpha subunit, a component of the endoplasmic reticulum translocon. *Archives of Medical Research* 31, S168–S170.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R.J., Schekman, R., 1992. Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 3, 129–142.
- Stock, R.P., Olvera, A., Sánchez, R., Saralegui, A., Scarfi, S., Sanchez-Lopez, R., Ramos, M.A., Boffa, L., Benatti, U., Alagón, A., 2001. Inhibition of gene expression in *Entamoeba histolytica* with antisense peptide nucleic acids oligomers. *Nature Biotechnology* 19, 231–234.
- Storrie, B., Nilsson, T., 2002. The Golgi apparatus: balancing new with old. *Traffic* 3, 521–529.
- Tovar, J., Fischer, A., Clark, C.G., 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amoebic parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 32, 1013–1021.
- Vargas-Rodríguez, L., Villagómez-Castro, J.C., Flores-Carreón, A., López-Romero, E., 1998. Identification and characterisation of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Parasitology* 28, 1333–1340.
- Vayssié, L., Vargas, M., Weber, C., Guillén, N., 2004. Double-stranded RNA mediates homology-dependant gene silencing of γ -tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 138, 21–28.
- Villagómez-Castro, J.C., Calvo-Méndez, C., Vargas-Rodríguez, L., Flores-Carreón, A., López-Romero, E., 1998. *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Experimental Parasitology* 88, 111–120.
- Walter, P., Blobel, G., 1980. Purification of a membrane-associated protein complex required for the protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 7112–7116.
- Walter, P., Johnson, A.E., 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annual Reviews of Cell Biology* 10, 87–119.