

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Aislamiento del cDNA que codifica para una proteína de *Entamoeba histolytica*, cuyo extremo C-terminal interacciona con EhRabB

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

EDUARDO CARRILLO TAPIA

TUTOR: DR. MARIO ALBERTO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ
Profesor titular del Departamento de Patología Experimental
CINVESTAV-IPN

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2005



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.

Agradecimientos:

Este trabajo se llevo a cabo en el laboratorio del Dr. Mario Alberto Rodríguez, al cual quiero expresar un gran sentimiento de gratitud por su ayuda y comprensión al dirigir esta tesis.

También quiero agradecer profundamente a la Dra. Esther Orozco por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A Guille y Rossy , por su apoyo técnico en el laboratorio y aun más por su amistad

A Alfredo, por su valiosa ayuda en el procesamiento de las imágenes y por su amistad.

Por su apoyo técnico:

Al Sr. Alberto García Miguel

A la Sra. Alejandrina Reyes Vivar

A Claudia Montiel Tovar por su apoyo secretarial

Por la revisión de tesis quiero agradecer a:

Dr. Sergio Vaca

Dr. Diego Arenas

Dr. Erasmo Negrete

M en C Irma Elena Dueñas

A mis compañeros del laboratorio : Adriana, Rosa Maria, Mario Alberto, Mónica, Andrés, Karina, Ramón, Máximo, Alberto, Xochitl, Jacobo, Leobardo, Guille, Elisa, Abigail, Cecilia, Cesar, Mavil, Esther H., Lalo F., Alejandrina, Israel, Lupita, Mayra, Juan P y Tomás.

A mis cuates de la escuela y de la vida: Paco, Quique, Alfredo, Bety y Ernesto Gaby, Renata, Claudia y Gustavo, Teresa, Miriam, Edgar, Alejandro, Balby, Alma, Julio, Jessica, Cintia, Hugo, César, Luis, Mario y Efraín.

Por ultimo quiero agradecer a todas las personas que de alguna o de otra manera, han contribuido a la realización del presente trabajo, con el objetivo de no olvidar a nadie y se me considere un ingrato este es para todos aquellos piensen que se los debo.

Dedicatorias:

A mis padres: Juana Tapia Sánchez y Elias Carrillo Cumbres, en agradecimiento por todo el apoyo que siempre recibo de su parte de manera incondicional y por que gracias a ese esfuerzo y apoyo he cumplido uno de los objetivos más importantes mi vida.

A mis hermanos, Elias y Carlos, por que siempre que los he necesitado están conmigo.

A Claudia mi esposa por su comprensión y esfuerzo de todos los días para que sigamos adelante y por ser para mi ese estímulo que necesito para poder estar despejado y seguro de mi.

A mis hijos Mauricio y Leonardo, por que desde que llegaron a mi, son lo mas importante que tengo en la vida y se han convertido en la mayor razón de lo que hago o deje de hacer.

Contenido

Índice	i
Lista de figuras	iii
Lista de tablas	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumen	vi
I Introducción	1
1.1 Amibiasis	1
1.2 Epidemiología	2
1.3 Clasificación taxonómica	3
1.4 Ciclo de vida	5
1.5 Características morfológicas del trofozoíto	7
1.6 Mecanismo agresor de <i>E. histolytica</i>	7
1.6.1 Adhesión	8
1.6.2 Efecto citolítico	10
1.6.3 Fagocitosis	12
1.7 Trafico vesicular	13
1.8 RAB GTPasas	15
1.8.1 Ciclo funcional de las proteínas Rab	16
II Antecedentes	18
1 Proteínas Rabs en <i>E. histolytica</i>	18
2 EhRabB	20
3 Identificación de una proteína con posible interacción con EhRabB	21
III Justificación	23
IV Objetivo General	23
V Objetivos Particulares	23
VI Materiales Y Metodos	24

1. - Obtención del DNA amibiano presente en el plásmido pPC86-Y	24
1.2.-Análisis de DNA por electroforesis en geles de agarosa	24
2.- Purificación de los fragmentos de DNA	25
3. - Tamizaje del banco de cDNA	25
3.1 Preparación de las replicas por duplicado	26
3.2. - Tratamiento de los filtros	27
3.3. - Marcaje radioactivo de la sonda	27
3.4. - Eliminación de nucleótidos no incorporados	28
3.5. – Hibridación	28
3.6. - Purificación de clonas candidato	29
4.7. - Escisión <i>in vivo</i> de los fagémidos recombinantes	30
4.8. - Análisis de las clonas candidato por el método de estrías	31
5. - Obtención de DNA de los plásmidos recombinantes	32
6. - Determinación del tamaño del inserto de las clonas candidato	33
7. - Secuenciación de DNA de plásmido de doble cadena	33
8- Determinación del número de copias	34
8.1. - Cultivo de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	34
8.2. - Extracción de DNA genómico de amibas	35
8.3. - Digestión enzimática del DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	36
8.4. - Determinación del número de copias del gen por hibridación tipo “southern”	36
VII Resultados	38
1 Aislamiento de la sonda	38
2 Tamizaje de un banco de cDNA	40
3 Caracterización de los candidatos	46
4 Número de copias del gen	57
VIII Discusión	59
IX Conclusiones.	62
X Bibliografía	63
XI Apéndice	70

Lista de Figuras

Figura 1 . Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Figura 2. Ciclo de GTPasa de las proteínas Rab.

Figura 3. Digestión del plásmido pPC86-Y.

Figura 4. Primer tamizaje de la genoteca de cDNA.

Figura 5 Segundo tamizaje de la genoteca de cDNA.

Figura 6. Hibridación de las estrías bacterianas con el fragmento PC86-Y.

Figura 7. Digestión de los candidatos obtenidos en el tamizaje.

Figura 8. Secuencia de los candidatos.

Figura 9. Secuencia de inserción en el candidato 2.1.

Figura 10. Amplificación del IS.

Figura 11. Secuencia 5' del gen PC86-Y.

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína PC86-Y.

Figura 13. Análisis de hélices transmembranales.

Figura 14. Identificación del número de copias del gen en el genoma de *Entamoeba histolytica*.

Lista de tablas

- Tabla I Clasificación taxonómica de *Entamoeba Histolytica*
- Tabla II Dominios presentes en la proteína pPC86-Y
- TABLA III Proteínas homólogas a la proteína identificada de *E. histolytica*

Lista de abreviaturas

SREHP	Proteína rica en serinas de <i>E. histolytica</i>
TYI-S-33	Medio de tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero para cultivo axénico de <i>E. histolytica</i> .
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
μl	Microlitro.
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Plimerase Chain Reation</i>).
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (<i>phosfate buffer saline</i>).
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero.
GTP	Guanidosin trifosfato.
GDP	Guanidil difosfato.
GAP	Proteína activadora de GTPasa.
GDI	Inhibidor de disociación de GDP.
GDF	Factor de disociación de GDP.
GEF	Factor intercambiador de guanina.
LB	Medio de cultivo (<i>Luria Broth</i>).
BSA	Albúmina sérica bovina .
°C	Grados centígrados.
h	Horas.
Min	Minutos.
Kb	kilobases.
M	Molar
μg	Microgramos.
μM	Micromolar.
MM	Milimolar.
MI	Mililitro.
Ng	Nanogramo.
TAE	Solución amortiguadora de Tris, ácido bórico y EDTA.

Resumen

Recientemente se identificó en *Entamoeba histolytica* el gen *EhRabB* el cual se ha relacionado con la fagocitosis, uno de los pasos del mecanismo agresor de este parásito causante de la amibiasis en el humano. En un trabajo previo a éste, se aisló e identificó un fragmento de 350 pb que interactúa con el producto del gen *EhRabB* y que por lo tanto, probablemente participe en la fagocitosis. Este fragmento corresponde al extremo 3' de un gen no caracterizado y se utilizó como sonda en el tamizaje de una genoteca de cDNA de *Entamoeba histolytica* en el presente trabajo. Del fragmento de 350 pb se obtuvieron 4 clonas candidatas que correspondían a diferentes longitudes del mismo gen aunque faltaron algunos nucleótidos hacia el extremo 5' de éste. Para conocer este extremo se hizo un análisis *in silico* del proyecto genoma de *Entamoeba histolytica*. Este estudio permitió además la identificación de un intrón de 149 pb en el gen. Posteriormente se hizo el análisis *in silico* de la proteína codificada por este gen donde se encontró que su secuencia presenta siete asas transmembranales. La proteína presentó de 21.8 % a 24.5 % de identidad con proteínas no caracterizadas de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, humano y ratón.

I Introducción

1.1 Amibiasis

La amibiasis está definida como la presencia de *Entamoeba histolytica* en el organismo humano, acompañada o no de manifestaciones clínicas (Kretschmer, 1994). Se trata de una enfermedad infecciosa de naturaleza primeramente intestinal, que se caracteriza por el surgimiento de lesiones inflamatorias y ulcerativas en el intestino grueso (Espinosa-Cantellano and Martinez-Palomo, 2000). El período de incubación de la amibiasis intestinal puede ser variado desde pocos días hasta meses o años pero generalmente es de 1-4 semanas (Tanyuksel and Petri, Jr., 2003). Si invade el epitelio intestinal puede causar una amplia variedad de alteraciones anatómicas, correspondientes a cuadro clínicos bien definidos que se conocen como colitis ulcerativa amibiana, disentería amibiana fulminante, ameboma o granuloma amibiano y apendicitis amibiana (revisado en Tanyuksel y Petri, 2003). Bajo ciertas condiciones, el parásito puede llegar a otros órganos principalmente al hígado provocando la amibiasis extraintestinal (Pérez-Tamayo, 1989). La amiba puede dañar severamente al hígado, provocando la amibiasis hepática que se caracteriza por la presencia de una o más áreas grandes de necrosis o abscesos.

1.2 Epidemiología

La amiba es un protozooario parásito cosmopólita, con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales, su presencia se encuentra relacionada a condiciones sanitarias deficientes, a la pobreza e ignorancia y probablemente al estado general de salud y nutrición del individuo (Cook, 1990).

En el mundo, la amibiasis afecta directamente a más de 50 millones de personas causando debilidad en ellas y el subsiguiente daño económico (Ravdin, 2000). En países industrializados afecta principalmente a inmigrantes, personas con inmunodeficiencias, hombres con actividades homosexuales, y personas que visitaron zonas endémicas de la enfermedad (Tanyuksel and Petri, Jr., 2003).

A nivel mundial se reconocen algunas áreas de alto riesgo entre ellas se encuentra el sur de África y Asia, el Medio Oriente, el sur y centro de América y México (Ravdin, 2000).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica y es considerado un grave problema de salud pública, puesto que se encuentra entre las primeras diez causas de mortalidad infantil por problemas gastrointestinales (Conde-Bonfil and Mora-Zerpa, 1992). Caballero y Salcedo (1994) encontraron que el 8.4% de la población mexicana es seropositiva para antígenos de *E. histolytica* y esta se incrementa marcadamente en zonas rurales en donde no hay drenaje ni agua. La prevalencia es más alta en niños de edad escolar probablemente debido a que el parásito se transmite de niño en niño por falta de hábitos de higiene adecuada (Cinfuentes *et al.*, 1994).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2003) reporta en México a la amibiasis como la quinta causa de morbilidad nacional con 1,013,535 casos

reportados en hombres y mujeres distribuidos principalmente en dos grupos de edades, el de 1-4 años con 196,634 casos y el de 25-44 años con 195,498 casos (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (2003).

En una revisión de reportes de amibiasis invasiva de 1929 a 1997 se encontró que la amibiasis invasiva (disentería, absceso hepático, perforación colónica, peritonitis, apendicitis y ameboma) mostró una predisposición mayor en hombres que en mujeres (la proporción hombre: mujer es de 3.2:1), sin embargo, la infección asintomática está igualmente distribuida entre ambos géneros (Acuna-Soto *et al.*, 2000).

1.3 Clasificación taxonómica

Inicialmente, se pensaba que *E. histolytica* había divergido de los eucariontes antes de la adquisición de mitocondrias y de otros organelos, sin embargo, los estudios filogenéticos basados en la comparación de las secuencias de la subunidad pequeña del DNA ribosomal (srDNA) han establecido que *E. histolytica* pertenece a un linaje relativamente cercano al de los eucariontes, sugiriendo que los antecesores de este parásito sufrieron la pérdida de estos organelos (Clark and Roger, 1995).

La clasificación taxonómica de *E. histolytica* presenta variaciones entre autores, sin embargo todos concuerdan en que pertenece al *phylum* de los *Rhizopodos* cuya característica es la presencia de pseudópodos en algún estadio de su vida y a la familia de los *Entamoebidae* cuyos miembros son todos parásitos. La tabla I muestra la clasificación propuesta por Levine y col (1980).

Tabla 1 clasificación taxonómica de *Entamoeba Histolytica* propuesta por Levine y colaboradores, (1980)

Supereino	<i>Eucariota</i>
Subreino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Sarcomastigophora.</i>
Subphylum	<i>Sarcodia</i>
Superclase	<i>Rhizopoda</i>
Clase	<i>Lobosea</i>
Subclase	<i>Gymnamoebia</i>
Orden	<i>Amoebida</i>
Suborden	<i>Tubulina</i>
Familia	<i>Entamoebida</i>
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

Sin embargo, para llevar a cabo la clasificación taxonómica más adecuada de cualquier organismo se deben de tomar criterios no solamente morfológicos, sino moleculares, fisiológicos y genéticos.

1.4 Ciclo de vida

EL ciclo de vida de este parásito (Fig. 1) comienza cuando se ingieren los quistes maduros (revisado por Ravdin, 2000). Las causas de infección por quistes son varias, entre ellas, la falta de limpieza en las manos y la presencia de materia fecal contaminada en aguas y alimentos (www.dpd.cdc.gov).

El quiste es ingerido y viaja a través del estómago y el intestino delgado. Los trofozoítos emergen en el íleon terminal. El enquistamiento ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y producen más quistes, los cuales salen con las heces fecales. Los quistes pueden sobrevivir por días o semanas debido a la protección que les confiere su pared a las condiciones del ambiente fuera del hospedero, hasta comenzar una nueva infección por alguna de las causas antes mencionadas. Los trofozoítos pueden salir en casos de diarrea pero son rápidamente destruidos fuera del hospedero. En algunos casos los trofozoítos quedan como comensales en el lumen intestinal y estos individuos pueden propagar los quistes, en algunos otros casos los trofozoítos pueden invadir la mucosa intestinal y llegar a otros órganos (www.dpd.cdc.gov).

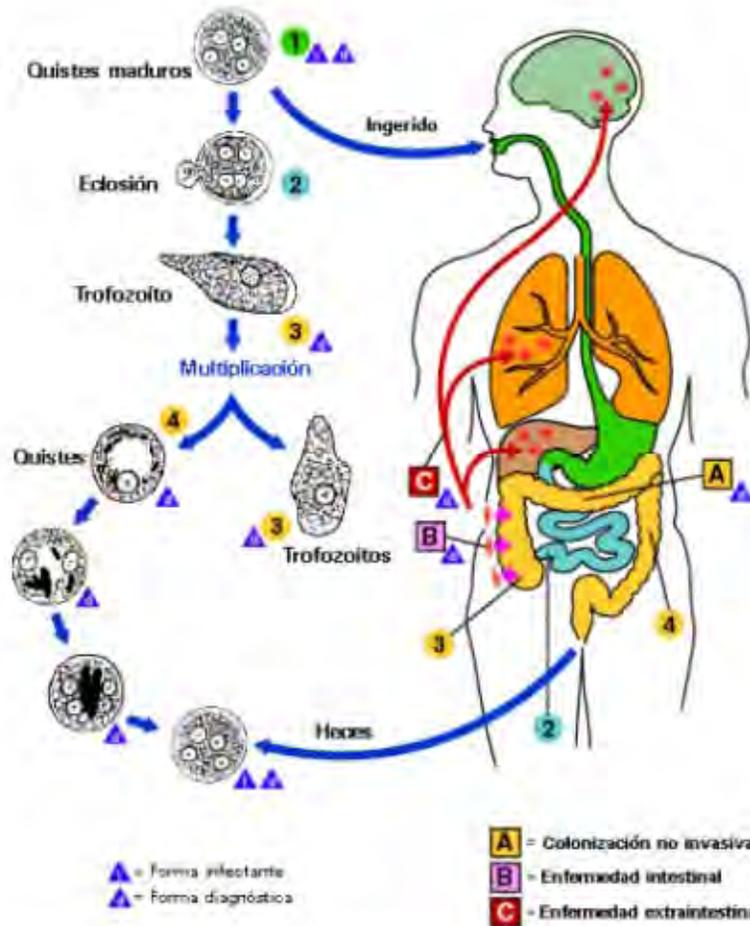
Ciclo de vida de *E. histolytica*

Figura 1 . Ciclo de vida de *E. histolytica*. Los quistes maduros contaminan el agua y alimentos, al ser ingeridos por el hombre, se desenquistan para dar origen a los trofozoitos que se multiplican para producir mas trofozoitos, los cuales pueden invadir la mucosa intestinal y atravesarla para invadir otros organos o desenquistarse y ser expulsados con las heces. Tomado de <http://www.dpd.cdc.govDPDx/HTML/Amebiasis.htm>

1.5 Características morfológicas del trofozoíto

E. histolytica es un organismo eucarionte, por tanto a diferencia de los procariontes tiene el núcleo organizado y posee un genoma complejo. El trofozoíto contiene varias vacuolas citoplásmicas y tiene organelos que difieren de los eucariontes superiores (Ghosh *et al.*, 1999); (Mazzuco *et al.*, 1997) *et al.*, 1997) y que han sido poco caracterizados. En el laboratorio se trabaja exclusivamente con la fase trofozoítica, ya que no ha sido posible propagar los quistes en cultivo. Los trofozoítos se cultivan en el medio axénico (sin otros organismos asociados) TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978).

El trofozoíto mide de 20-40 μm , es pleomórfico y muy dinámico, se desplaza por medio de la formación de pseudópodos (revisado por Ravdin, 2000). El citoplasma es rico en glicógeno y tiene un núcleo esférico que mide de 4-7 μm de diámetro (revisado por Ravdin, 2000). Su citoesqueleto está formado por actina, miosina y tubulina (Vázquez *et al.*, 1995). Los filamentos de actina F se detectan en la parte posterior de los trofozoítos, en el uroide, en las “bocas fagocíticas” mientras que la actina despolimerizada (actina G) se concentra en los pseudópodos (Bailey *et al.*, 1992).

1.6 Mecanismo agresor de *E. histolytica*

La virulencia de *E. histolytica* es un fenómeno multifactorial, en el que participan varias moléculas, y eventos biológicos (García-Rivera *et al.*, 1999) y muchos otros

factores pueden no estar identificados aún. Sin embargo, tres factores que contribuyen a la patogenicidad de *E. histolytica* han sido muy estudiados y caracterizados a nivel molecular (Ravdin, 2000): i) La adhesión a las células del hospedero; ii) La citólisis mediada por las proteínas que forman poros en las membranas celulares del hospedero y por cisteínas proteasas; iii) La fagocitosis donde intervienen proteínas de tráfico vesicular y proteínas reguladoras del citoesqueleto,(Ravdin, 2000).

1.6.1 Adhesión

Dentro de los eventos que se presentan en el proceso patogénico, la adhesión del microorganismo a la célula blanco es un evento importante ya que le permite a éste resistir la acción de fuerzas mecánicas. La adhesión no es un carácter exclusivo de los microorganismos patógenos y por lo tanto, no es un indicador de patogenicidad (Rodríguez, 1990). De hecho, la adhesión de algunos microorganismos no patógenos a las mucosas de los animales tiene un papel importante en el mantenimiento de la flora bacteriana “normal” (Savage and Blumersshine, 1974).

Varias proteínas de la superficie celular de *E. histolytica* han sido involucradas en la unión de los trofozoítos con la célula blanco. Una de las moléculas más ampliamente caracterizadas es la lectina inhibible por galactosa y N-acetilgalactosamina (Petri, Jr. *et al.*, 1987). Esta lectina se purificó originalmente por cromatografía de afinidad a carbohidratos y con anticuerpos monoclonales

(mAb) (Petri, Jr. *et al.*, 1987). La lectina Gal/GalNAc está constituida por un heterodímero de 260-kDa, compuesto por una subunidad grande de 170 kDa y otra de 35 kDa unidos por puentes disulfuro, las cuales co-purifican con una subunidad intermedia de 150 kDa (Mann and Lockhart, 1998). La purificación del heterodímero de 260 kDa retiene la actividad de unión a GalNAc para las células y glicoproteínas (Petri, Jr. *et al.*, 1989).

La familia de genes que codifican las subunidades de la lectina fue caracterizada por electroforesis en campos pulsados. La subunidad pesada de la lectina está codificada por cinco genes y la subunidad ligera esta codificada por una familia de al menos tres genes (Ramakrishnan *et al.*, 1996).

Recientemente se ha observado que la subunidad ligera está involucrada en la patogénesis del parásito, y ejerce un efecto negativo dominante pues amibas transfectadas con plásmidos que codifican formas truncadas del gen *hgl1* y que forman una subunidad ligera de 30 kDa en la amiba, muestran una disminución en su habilidad para adherirse a células de mamífero, así como para fagocitar eritrocitos (Katz *et al.*, 2002).

Otra molécula caracterizada con propiedades de lectina es la de 220 kDa, la cual fue aislada por electroelución de geles de poliacrilamida, esta proteína es capaz de aglutinar eritrocitos (Rosales-Encina *et al.*, 1987). Se ha sugerido que la lectina de 220 kDa tiene distintos epítopes que generen distintos patrones de respuesta inmune, pues células de bazo de ratones inmunizados con la proteína completa fueron incapaces de proliferar, no así las células de ratones inmunizados con péptidos de la proteína o la proteína fragmentada (Talamas-Rohana *et al.*, 1995).

Otra proteína involucrada en la adhesión de la amiba es la proteína conocida como SREHP o proteína rica en serinas descrita por Stanley y colaboradores en 1990. El DNA que codifica para esta proteína se ha utilizado como vacuna contra el absceso amibiano hepático en roedores y se ha reportado que genera altos porcentajes en la protección en los animales (Zhang and Stanley, Jr., 1999).

La adhesina de 112 kDa es otra proteína que puede interactuar con la célula blanco y en conjunto con las anteriores hacer más específico el contacto (García-Rivera *et al.*, 1999). La adhesina de 112 kDa se identificó empleando anticuerpos monoclonales inhibidores de la adhesión y mutantes deficientes en adhesión (Arroyo and Orozco, 1987). A través de estudios de microscopía electrónica e inmunofluorescencia indirecta se observó que la adhesina de 112 kDa se localiza en forma uniforme en la superficie de los trofozoítos amibianos y en la membrana de algunas vacuolas (García-Rivera *et al.*, 1999). Esta adhesina es muy inmunogénica, pues es una de las principales proteínas reconocidas en sueros de pacientes con absceso hepático amibiano (Arroyo and Orozco, 1987). La adhesina de 112 kDa también puede participar en la invasión de los tejidos, puesto que la proteína purificada presenta una actividad proteolítica significativa (García-Rivera *et al.*, 1999). Esta adhesina está formada por dos subunidades: una con actividad de proteasa y otra con un motivo de adhesión por lo que ahora se denomina complejo EhCPADH (García-Rivera *et al.*, 1999).

1.6.2 Efecto citolítico

La citólisis del tejido hospedero se inicia después de la adhesión de los trofozoítos a la célula blanco (Ravdin, 2000). La secreción de cisteína proteasas es un factor importante para determinar el grado de agresividad de los trofozoítos, de la misma forma está demostrado que monocapas de fibroblastos son destruidas por las cisteínas proteasas purificadas de este parásito (Keene *et al.*, 1990).

Las proteasas de *E. histolytica* son inhibidas por bloqueadores específicos para las cisteína proteasas y no por los inhibidores de las serina proteasas por lo que son clasificadas como cistein tiol proteasas (Que and Reed, 2000).

Uno de los genes de la proteína de 112 kDa, codifica para una cisteína proteasa (*EhCP112*), que es capaz de degradar colágena, fibronectina y hemoglobina, *EhCP112* tiene un rango amplio de actividad en pH y temperatura (Ocádiz *et al.*, 2005).

La citólisis de *E. histolytica* también puede estar mediada por proteínas que forman poros en las células blanco y que son llamadas amebapóros (Young *et al.*, 1982). Estas proteínas establecen contacto con la célula blanco e inmediatamente inician eventos de lisis celular. Existen tres isoformas de amebapóro: A, B y C, las cuales están presentes en los trofozoítos en una proporción 35:10:1, respectivamente (Leippe *et al.*, 1994). La inhibición de la expresión de los genes del amebaporo, disminuye significativamente la patogenicidad de amibas de cepa HM-1:IMSS tranfectadas con un plásmido que contenía el gen del amebaporo isoforma A en antisentido (Bracha *et al.*, 1999).

1.6.3 Fagocitosis

Los trofozoítos de *E. histolytica* son fagocitos profesionales con una gran capacidad de internalizar una variedad de material particulado e incluso células como bacterias, células epiteliales y glóbulos rojos (Rabinovitch, 1995).

La fagocitosis también juega un papel importante en la patogenia de *E. histolytica*, pues mutantes deficientes en fagocitosis también son deficientes en la producción de abscesos hepáticos en modelos animales ((Orozco *et al.*, 1983);(Rodríguez and Orozco, 1986). Un modelo propuesto para el mecanismo de fagocitosis en *E. histolytica* (Orozco *et al.*, 1988) postula que los trofozoítos son atraídos quimiotácticamente hasta las células blanco, posteriormente, se realiza la unión de los trofozoítos amibianos a la superficie de la célula blanco, mecanismo en el que intervienen las adhesinas localizadas en la superficie de la amiba y receptores presentes en la superficie de las células blanco. Una vez adheridas, las células blanco y las amibas sufren una redistribución de receptores y ligandos presentes en la superficie, lo que produce una señalización interna en el trofozoíto que permite la liberación de enzimas que lisan a las células blanco. Más tarde el trofozoíto emite pseudópodos que envuelven a las células blanco y las introduce en vacuolas fagocíticas, que se fusionan después con los lisosomas para formar los fagosomas, donde las enzimas digestivas actúan sobre el material fagocitado.

Se sabe que el complejo EhCPADH participa también en la fagocitosis, ya que es una de las moléculas de la amiba que se adhieren a la célula blanco y que se introduce con ellas durante el proceso de ingestión, primero a través del canal fagocítico y después en las vacuolas fagocíticas (García-Rivera *et al.*, 1999).

Finalmente, al término de la digestión de la célula blanco, la adhesina vuelve a la membrana plasmática (García-Rivera *et al.*, 1999). También se ha descrito que en la fagocitosis de *E. histolytica* participan moléculas del citoesqueleto (Bailey *et al.*, 1992); (Guillén *et al.*, 1998), moléculas reguladoras de la organización del citoesqueleto (Guillén, 1996) y probablemente moléculas que regulan el tráfico vesicular, como EhRabB, la cual se ha sugerido participa en la regulación del proceso de endocitosis (Rodríguez *et al.*, 2000), además de EhRab7, que se ha propuesto está unida a endosomas tempranos (Welter *et al.*, 2002) y EhRabB5 involucrada en la fagocitosis de eritrocitos y en el empaquetamiento de hidrolasas lisosomales, por lo que se ha indicado es importante en la formación de vesículas para la ingestión de la célula (Saito-Nakano *et al.*, 2004).

1.7 Tráfico vesicular

Una característica notable de *E. histolytica* es su alta actividad endo y exocítica incluyendo la velocidad de fagocitosis y la secreción de proteasas, ambas funciones relacionadas con la patogenicidad del parásito (Orozco *et al.*, 1983); (Rodríguez and Orozco, 1986); (Muñoz *et al.*, 1991). Sin embargo, los organelos y las moléculas del trofozoíto involucradas en estos procesos están poco definidos. En organismos eucariontes, el tráfico vesicular se lleva a cabo por un grupo de compartimentos de membrana altamente dinámicos que son responsables del empaquetamiento, clasificación, secreción y reciclamiento de proteínas secretorias. Las glucoproteínas de membrana y las enzimas lisosomales son

sintetizadas en polirribosomas y traslocadas en el retículo endoplásmico (RE). Estas proteínas salen del RE por vesículas cubiertas con proteínas llamadas COP II, las cuales sirven para dirigirlas hasta el compartimiento intermedio RE-Golgi (CIRG o grupos tubovesiculares GTVs); de ahí ellas pueden ser transportadas a la red cis-Golgi (CGN) por medio de vesículas recubiertas con proteínas llamadas COP I, que también funcionan en el transporte retrógrado (del complejo de Golgi al RE). Subsecuentemente, las proteínas pueden atravesar la cisterna del complejo de Golgi por acarreadores vesiculares o por maduración de la cisterna (Olikkonen and Stenmark, 1997) . Las enzimas lisosomales se unen a receptores de manosa-6-fosfato en el Golgi y son englobadas en vesículas cubiertas de clatrina en la red trans-Golgi (TNG) y liberadas en endosomas tempranos o tardíos .Las proteínas de membrana y las secretorias son seleccionadas en TNG y liberadas por exocitosis a lo largo de la vía secretoria (Olikkonen and Stenmark, 1997). La vía endocítica mejor caracterizada es la mediada por clatrina, que median el transporte de la superficie celular a través de la vía endocítica, así como también el transporte de proteínas de TNG a compartimientos vacuolares o lisosomas. Otras vías incluyen vesículas que no están recubiertas con clatrina o vesículas cubiertas por caveolina, las cuales son responsables del tráfico entre compartimientos de la vía secretoria temprana y posiblemente el tráfico del TNG a la superficie celular (Olikkonen and Stenmark, 1997).

Los factores necesarios para la fusión entre organelos o compartimientos aceptores y donadores incluye: i) la Rab GTPasa que regulan la fusión de las vesículas mediante ciclos de unión e hidrólisis de GTP; II) proteínas integrales de membrana conocidas como SNAREs (por su siglas en ingles Soluble N-ethylmaleimide-sensitive

attachment protein receptor) necesarias para el reconocimiento de las vesículas y el organelo receptor; y iii) las ATPasas tipo AAA (Gerst, 1999).

1.8 RAB GTPasas

Las Rab-GTPasas son proteínas que se encuentran en toda las células eucariotas, forman parte de la súper familia de pequeñas Ras GTPasas, cuyos integrantes son las subfamilias Ras, Rho y Rab incluyendo los grupos ARF, Sar y Ran (Valencia *et al.*, 1991); (Sander and Valencia, 1995). En *Saccharomyces cerevisiae* han sido identificadas un total de 11 proteínas Ypt nombre dado a las proteínas Rab en levaduras, mientras que en células de mamífero se han identificado más de 50 miembros pertenecientes a la familia Rab (Pereira-Leal and Seabra, 2000). Estas proteínas están presentes en diferentes compartimientos (Hay and Scheller, 1997) y se denominan con un número de acuerdo a su orden de identificación. Por ejemplo, Rab 1 se encuentra presente en RE y complejo de Golgi (Bacón *et al.*, 1989); Rab 5A se localiza en membrana plasmática y vesículas cubiertas por clatrina y endosomas primarios (Fischer *et al.*, 1994) y Rab 7 que se encuentra ubicada en endosomas tardíos (Chavrier *et al.*, 1990).

La proteínas Rab presentan un dominio que las hace diferentes de los otros miembros de la superfamilia Ras llamada región efectora o región determinante de complementariedad (CDR), la cual no se encuentra conservada entre los miembros de la familia Rab por lo que se ha propuesto que determina

interacciones específicas entre proteínas Rab unidas a GTP y sus efectores (Ostermeier and Brunger, 1999). La región mas variable de las Rab es la región carboxilo terminal, la cual tiene una cisteína que contiene una modificación hidrofóbica (geranilo-geranilo) que es un prerrequisito para la asociación membranal de las proteínas Rab (Olkkonen and Stenmark, 1997). La región C-terminal contiene la información para la localización correcta de las proteínas en sus sitios específicos dentro de la célula (Brennwald and Novick, 1993).

Las proteínas Rab pueden cambiar de una fase activa (unida a GTP) a una fase inactiva (unida a GDP). Este “switch” es controlado en parte, por la asociación transitoria de la proteína Rab con las proteínas regulatorias (Olkkonen and Stenmark, 1997).

1.8.1 Ciclo funcional de las proteínas Rab

Para regular su función, las proteínas Rab, sufren un ciclo de interacciones con membranas y otras proteínas (González, Jr. and Scheller, 1999). Las proteínas Rab son modificadas post-traduccionalmente en las cisteínas localizadas en su región C-terminal por la adición de dos grupos geranil-geranil, los cuales promueven la asociación con las membranas vesiculares cuando Rab está unida a GTP que es el estado activo.

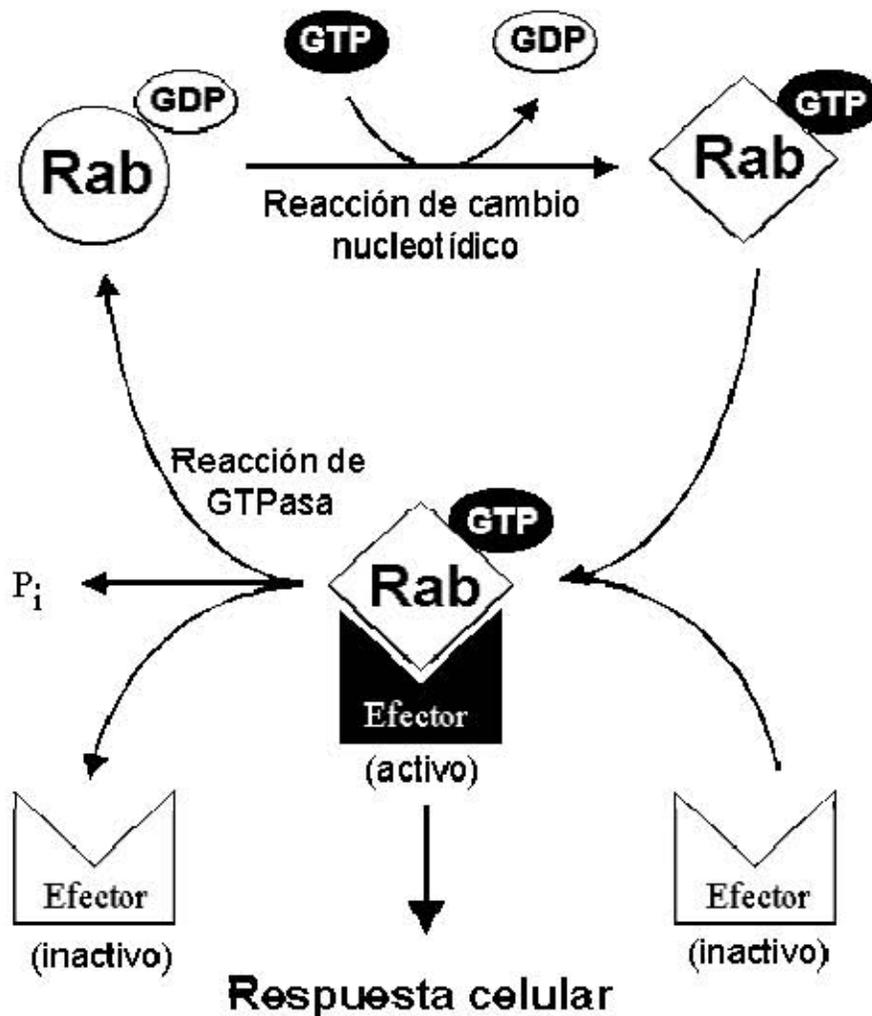


Figura 2. **Ciclo de GTPasa de las proteínas Rab.** Después del cambio de una forma GDP por una GTP, la proteína sufre un cambio conformacional. La forma GTP produce ligaduras y activa moléculas efectoras específicas, lo cual induce una respuesta celular (fusión de membrana). El efector se separa después de la hidrólisis de GTP, y la proteína Rab regresa a su conformación GDP "inactiva". La alternancia en las conformaciones GDP y GTP permite que Rab actúe como un "switch molecular" regulando el transporte intracelular (Tomado de Olkkonen y Stenmark, 1997).

Después de ocurrida la hidrólisis del nucleótido guanina, la proteína Rab es extraída de la membrana formando un complejo con GDP y un inhibidor citosólico de disociación de (GDI) (González, Jr. and Scheller, 1999). El intermediario citosólico es entonces reciclado a una vesícula de nueva formación, a través de un factor secundario que desplaza al GDI denominado factor de desplazamiento de GDI (GDF) (González, Jr. and Scheller, 1999). Una vez que la proteína Rab se une a la membrana, un factor intercambiador del nucleótido de guanina (GEF) promueve la liberación de GDP y la subsiguiente unión del GTP (González, Jr. and Scheller, 1999). En su conformación activa, Rab es capaz de asociarse con un grupo de efectores, los cuales disparan los eventos que guían a la fusión eventual de la vesícula con la membrana blanco (González, Jr. and Scheller, 1999). Por último, una proteína activadora de GTPasa (GAP) acelera la hidrólisis del nucleótido (González, Jr. and Scheller, 1999). La proteína Rab unida a GDP que es la forma inactiva puede entonces participar en un nuevo episodio de fusión (Figura 2) (González, Jr. and Scheller, 1999).

II Antecedentes

1 Proteínas Rabs en *E. histolytica*

Aunque los trofozoítos de *E. histolytica* no presentan estructuras típicas de RE o aparato de Golgi, la actividad endo y exocítica que muestran también pueden estar regulada por proteínas relacionadas a miembros de la familia Rab.

De hecho, ya se han identificado varias proteínas pertenecientes a esta familia en la amiba, entre las cuales están proteínas con alta homología a proteínas Rab de

mamíferos, sugiriendo que estas proteínas amibianas pueden tener una función similar a la observada en su contraparte en mamíferos. Por ejemplo EhRab8, que es una proteína de 22.7 kDa y se encuentra distribuida a lo largo del citoplasma en los trofozoítos. Su localización sugiere que puede estar participando en la fusión vesicular en estados tardíos de secreción como sucede en células de mamífero (Juárez *et al.*, 2001). Otra proteína Rab identificada en este parásito es EhRab5, la cual presenta un 45% de identidad con la proteína Rab5 de mamífero, y es requerida en la fusión de endosomas tempranos (Saito-Nakano *et al.*, 2000). Rab11 es una familia de pequeñas GTPasas con tres miembros en *E. histolytica* que son EhRab11A, EhRab11 B y EhRab 11C (Temesvari *et al.*, 1999). Los estudios de estas proteínas sugieren que están involucradas en el proceso de enquistamiento de *E. histolytica* (McGugan, Jr. and Temesvari, 2003). Otro miembro de la familia Rab en *E. histolytica* es EhRab7 (Welter *et al.*, 2002). Los estudios sugieren que esta proteína se encuentra unida a vesículas y que puede participar en la entrada y fusión de vesículas y en los estados tempranos de la endocitosis de *E. histolytica* (Welter *et al.*, 2002). Además, en *E. histolytica* se han identificado otras proteínas Rab sin identidad significativa a otros miembros de Rab, por lo que estas proteínas se denominan de EhRabA hasta EhRabI (Saito-Nakano *et al.*, 2001; Temesvari *et al.*, 1999); (Rodríguez *et al.*, 2000). La proteína EhRab A se ha sugerido puede estar funcionando en la formación de extensiones de membrana o regulando la entrega de moléculas de superficie celular (Welter and Temesvari, 2004). Mientras que la proteína EhRabB, posiblemente esta involucrada en el proceso de fagocitosis (Rodríguez *et al.*, 2000).

2 EhRabB

Como se mencionó anteriormente, una de las moléculas que participan activamente en la patogenicidad de *E. histolytica* es la adhesina de 112 kDa, la cual esta formada por dos polipéptidos: una cisteína-proteasa (EhCP112) y una proteína con un dominio de adhesión (EhADH112). Estos polipéptidos son codificados por dos genes (*Ehcp112* y *Ehadh112*) separados entre si por 188 pb (García-Rivera *et al.*, 1999).

Recientemente, se identificó un gen de 576 pb (*EhRabB*) a 332 pb río arriba del gen *Ehcp112*, pero en la cadena complementaria, y codifica una proteína de 192 aminoácidos (EhRabB) (Rodríguez *et al.*, 2000). Al realizar ensayos de Southern blot y PCR, se confirmó que *EhrabB* y *Ehcp112* se encuentran adyacentes en el genoma de la amiba (Rodríguez *et al.*, 2000). La proteína EhRabB se localizó en vesículas citoplasmáticas que se traslocan a la membrana plasmática y a bocas fagocíticas cuando los trofozoítos se incuban con células blanco (Rodríguez *et al.*, 2000). Además, la expresión de la proteína se incrementa durante la fagocitosis (Reyes-López, 2000). Estos resultados sugieren que la proteína EhRabB pudiera participar en la fagocitosis, un evento de patogenicidad de *E. histolytica*.

3 Identificación de una proteína con posible interacción con EhRabB

Como se mencionó anteriormente, la función de las proteínas Rab esta regulada por la interacción con diferentes proteínas como GDIs, GDFs, GAPs y diversas proteínas efectoras. Por tal razón fue de interés identificar las proteínas ambientales que regulan la función de EhRabB y que por lo tanto están involucradas en la fagocitosis. Con este fin se realizaron ensayos de doble híbrido en levaduras, usando el gen *EhRabB* y una genoteca de cDNA de *E. histolytica* (Picazarri, 2001). El doble híbrido es un método genético, el cual es un sistema *in vivo* capaz de identificar las interacciones entre dos proteínas y se realiza dentro de una levadura que carece en su genoma del gen que codifica para el factor de transcripción *Gal4*. Esta es una proteína de 881 aminoácidos que se une específicamente a secuencias consenso de DNA y que activa la transcripción de genes cercanos (Mcknight and Yamamoto, 1992). GAL4 contiene en su extremo amino terminal el dominio de unión a DNA (BD) de 146 aa dependiente de Zn^{+2} (Keegan *et al.*, 1986);(Johnston, 1987);(Pan and Coleman, 1990) y en su extremo carboxilo dos regiones de activación ácida, las cuales pueden activar la transcripción una vez que el BD se ha unido al DNA (Ma and Ptashne, 1987). En levaduras, el BD de GAL4 puede unirse al DNA pero por si solo no puede activar la transcripción sino que necesita de un dominio de activación (AD) (Keegan *et al.*, 1986).

Para identificar las interacciones proteína-proteína en el sistema de doble híbrido, la levadura contiene uno o más genes reporteros integrados de manera estable en su genoma que presentan en su secuencia promotora el sitio de unión a GAL4.

Entonces, el gen *Ga4* es transformado en la levadura dividido en dos fragmentos, cada uno codificado en un plásmido diferente. El dominio de unión a DNA (conocido como cebo), interacciona con la secuencia de unión a GAL4 en la región promotora de los genes reporteros, y el segundo fragmento incluye el “dominio de activación” (conocido como presa) que se une a factores básicos de la transcripción. Estos fragmentos no se unen *in vivo*, a menos que existan como proteínas de fusión a diferentes péptidos que interaccionan entre sí. Así, la activación de los genes reporteros se obtiene solo cuando los dos fragmentos de GAL4 se unen mediante proteínas que interaccionan *in vivo*.

El sistema de doble híbrido fue utilizado en nuestro laboratorio para tratar de identificar proteínas amibianas que se unen a *EhRabB* (Picazarri, 2001). En esos experimentos la proteína EhRabB se utilizó como cebo y como presa se utilizó una genoteca de cDNA. Mediante esta estrategia se obtuvo un cDNA de *E. histolytica* de 372 pb (Picazarri, 2001). La secuencia de aminoácidos, deducida de la de nucleótidos, mostró la presencia de un marco de lectura abierto que codifica 94 aa, el cual carece de la metionina inicial. En los nucleótidos 286-288 se identificó una señal de paro de la traducción y a 34 nucleótidos después se localizó la cola de poli(A), sugiriendo que en esta clona se encuentra hacia el extremo 3' del gen que inicialmente se denominó *pPC86-Y* (Picazarri, 2001). El análisis *in silico* del polipéptido codificado por este fragmento de cDNA no permitió determinar la posible identidad de la proteína codificada, por lo que es necesario aislar el gen completo de la proteína para poder obtener una mejor caracterización de ésta.

III Justificación

Debido a nuestro interés de identificar las proteínas amibianas que regulen la función de EhRabB y que estén involucradas en la fagocitosis, mediante el sistema de doble híbrido se obtuvo sólo el extremo carboxilo de una proteína de fusión lo cual nos indica que existe una interacción *in vivo*, es por esto que nos propusimos aislar de una genoteca de cDNA el gen completo mediante un tamizaje utilizando como sonda el extremo 3' del gen aislado por el sistema de doble híbrido.

IV Objetivo General

Aislar y caracterizar el gen completo que codifica la proteína de interacción con EhRabB.

V Objetivos Particulares

1. Obtener el gen completo mediante el tamizaje de un banco de cDNA de *E. histolytica*.
2. Determinar el número de copias del gen en el DNA de *E. histolytica*.
3. Caracterizar *in silico* la proteína codificada por el gen aislado.

VI Materiales Y Métodos

1. - Obtención del DNA amibiano presente en el plásmido pPC86-Y

2µg del plásmido pPC86-Y (Picazarri, 2001) se digirieron por dos horas a 37 ° C con las enzimas Sal I y Not I. La reacción se realizó en un volumen final de 30 µl de una mezcla que contenía: 1.5 µl del plásmido, 3 µl de amortiguador H 10X (New Englad Biolabs), 1U de la enzima Sal I (Enzibiof) y 1 U de la enzima Not I (New England Biolabs).

1.2.-Análisis de DNA por electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA se analizaron en geles de agarosa al 1%, de acuerdo al método descrito por (Sambrook *et al.*, 1989), en cámaras para electroforesis Owl Scientific (EUA). Los geles se prepararon mezclando 100 mg de agarosa (BioRad, EUA) en 10 ml de solución amortiguadora de corrida TAE IX (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M), la mezcla se fundió hasta incorporar perfectamente la agarosa, después se vertió en un recipiente en donde se colocó el peine adecuado y se incubaron a temperatura ambiente hasta que solidificaron. Entonces, los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y se agregó solución amortiguadora de corrida TAE IX hasta cubrir totalmente la superficie de los geles. Para someter el DNA a la electroforesis, éste se mezcló con 0.1 volúmenes de solución de carga (ficoll 400 al 25 %; azul de bromofenol al 0.25 % y xilencianol la 0.25 % Sigma, EUA) y se depositó en los pozos de los geles. La electroforesis se

realizó a 100 voltios durante aproximadamente 45 min. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron el marcador VI (New England Biolabs, EUA.) y el DNA del fago λ digerido con *Hind* III. Las muestras se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) por 3 min, se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta de 310 nm y se registró mediante el equipo gel doc 1000 (BIORAD)

2.- Purificación de los fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA separados por electroforesis se purificaron utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen). Para ello, las bandas de interés se aislaron del gel, se pesaron y se agregaron 3 volúmenes del buffer QG y se incubaron por 10 min a 55 ° C. Posteriormente, se agregó un volumen de isopropanol, mezclándolo perfectamente, las muestras se colocaron en una columna del kit y se centrifugaron a 5000 x g durante 1 min. A continuación a las columnas se les agregó 750 μl de solución PE, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 5000 x g por 1 minuto, el sobrenadante se eliminó y se repitió una vez mas este paso hasta eliminar los residuos de etanol. Las columnas se colocaron en tubos eppendorf nuevos y el DNA se eluyó con 50 μl de agua y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3. - Tamizaje del banco de cDNA

La clonación del gen se llevó a cabo por medio del tamizaje de un banco de cDNA de

E. histolytica (Sánchez *et al.*, 1994) utilizando el protocolo descrito por el proveedor (Stratagene CA, EUA), el cual consistió de los siguientes pasos:

3.1 Preparación de las replicas por duplicado

La bacteria *E. Coli*, cepa ,XL1-Blue, se estrió en placas de medio Luria-Bertani (LB: bactotripton 1%; extracto de levadura 0.5%; NaCl 1% y bactoagar 1.5%) que contenían 50 µg/ml de tetraciclina. Al día siguiente, una colonia se creció en medio líquido LB (bactotripton 1%; extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) suplementado con 0.2% de maltosa y 10 mM MgSO₄ hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ = 0.5. La infección de la bacteria con los fagos conteniendo el cDNA de la amiba (Sánchez *et al.*, 1994), se llevó a cabo de la siguiente manera: 50 µl de una suspensión de fagos recombinantes (50,000 unidades formadoras de placas) del banco de cDNA y 200 µl del cultivo bacteriano antes mencionado se incubaron por 15 min a 37°C. Después, se añadieron 8 ml de medio NZY suave (NaCl 0.5%; MgSO₄.7H₂O 0.2%; extracto de levadura 0.5%; hidrolizado de caseína 1% y agarosa 0.7%) previamente fundido y enfriado a 55°C. La mezcla se agitó brevemente antes de vaciar sobre una placa con medio NZY de 150 mm de diámetro (NaCl 0.5%; MgSO₄.7H₂O 0.2%; extracto de levadura 0.5%; hidrolizado de caseína 1% y bactoagar 1.5%). Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se incubaron 2 h a 4°C, para evitar que el agar se pegara a las membranas de nylon. Para hacer las réplicas por duplicado se utilizaron membranas de nylon (Colony/Plaque Screen, NEN. USA), las cuales se numeraron y se colocaron

secuencialmente por duplicado sobre las cajas, evitando la formación de burbujas. Las membranas se marcaron asimétricamente con tinta india en 3 o 4 puntos, utilizando una aguja del No. 20. El primer filtro se dejó sobre la caja 2 min y el segundo se dejó 7 min. Los filtros se retiraron de las cajas utilizando para ello un par de pinzas (Millipore, USA) y se dejaron secar al aire (la superficie del filtro que estuvo en contacto con el gel se colocó hacia arriba) sobre una hoja de papel filtro 3 MM (Whatman).

3.2. - Tratamiento de los filtros

Los filtros secos se colocaron uno por uno y de manera secuencial en dos diferentes soluciones contenidas sobre un papel filtro humedecido. Primero se colocaron en solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M) por 2 min., este paso se repitió con solución desnaturalizante nueva, después se colocaron en solución neutralizante (Tris-HCl 1.0 M, pH 7.5) por 2 veces durante 2 min. Los filtros se dejaron secar al aire sobre una hoja de papel filtro 3MM y el DNA se fijó a los filtros de nylon por irradiación con luz ultravioleta (UV) durante 2 min. en un entrecruzador (UV-Stratalinker, Stratagene).

3.3. - Marcaje radioactivo de la sonda

El fragmento de DNA aislado del plásmido pPC86-Y, se marcó radioactivamente con [³² P] dATP (Amersham, EUA) por la técnicas de iniciadores al azar, según

Feinberg y Vogelstein, (1983), de acuerdo al protocolo de Boehringer Mannheim (Alemania). El fragmento purificado (50-100 ng) se desnaturalizó por incubación en un baño de ebullición durante 5 minutos, inmediatamente después se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, este DNA se marcó radioactivamente en 20 μ l de mezcla de reacción que contenía: Tris 50 mM, pH 7.2; $MgCl_2$ 10 mM; DTT 10; albúmina sérica bovina 200 μ l; 5 μ l de DNA, 18 μ l de agua, 1 μ l dCTP, 1 μ l dGTP, 1 μ l dTTP, 30 μ Ci [$\alpha^{32}P$] y 1U del fragmento Kleenow de la enzima DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. La mezcla de reacción se incubó a 37 ° C durante 10 minutos y se detuvo al agregar 5 μ l de solución TEN (NaCl 0.1M; Tris-HCl 10 mM, pH 8 y EDTA 1mM, pH 8).

3.4. - Eliminación de nucleótidos no incorporados

La mezcla de marcaje (25 μ l) de la sonda se pasó a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada con TE (Tris 100 mM pH 8.0, EDTA 1mM) y se centrifugó durante 2 min a 1000 x g en una centrífuga clínica (Head-Safety Centrifuge). El eluido con el DNA marcado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.5. - Hibridación

Los filtros de nylon conteniendo el banco de cDNA de *E. histolytica* se humedecieron con solución de SSC 2X (SSC 1X: NaCl 150 mM, Citrato de sodio 15 mM, pH 7), para evitar que absorbieran demasiada solución de prehibridación.

Posteriormente, para evitar uniones inespecíficas de la sonda, las membranas se prehibridarán a 42°C durante al menos 4 h en una solución que contenía: SSC 6X, solución de Denhart 5X (Denhart's 50X: Ficoll 400 1%; polivinilpirrolidona 1% y BSA 1%), SDS 0.5% y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml, previamente incubado 5 min en un baño de agua hirviendo y después 5 min en hielo. Para rastrear el banco de cDNA, a la mezcla de prehibridación se le agregarán 1×10^6 cpm/ml de la sonda previamente desnaturalizada por incubación durante 5 min en ebullición. Los filtros se incubaron con esta sonda durante 18 h a 42°C. Después, los filtros se lavaron por 5 periodos de 20 minutos con diferentes concentraciones de SSC (2X, 1X, 0.5X, 0.1X) y a diferentes temperaturas desde temperatura ambiente hasta llegar a los 65° C. Posteriormente, los filtros se expusieron a una placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) durante 4 días a -70°C en presencia de una pantalla intensificadora.

3.6. - Purificación de clonas candidato

Las placas líticas que dieron señal positiva por duplicado se aislaron y se procedió a realizar una segunda hibridación con la misma sonda como se describió en la sección anterior, excepto que se utilizaron de 100 a 200 ufp en cajas de Petri de 90 mm. Las placas líticas que dieron señal positiva por duplicado en el primer tamizaje se recuperaron de la caja de Petri utilizando el diámetro mayor de una pipeta pasteur estéril y se colocaron por separado en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de solución SM (NaCl 100 mM; MgSO₄ 10 mM; gelatina 0.01% y Tris-HCl 50 mM, pH

7.5) y 30 μ l de cloroformo. Los tubos se agitaron en vortex y se almacenaron toda la noche a 4°C para permitir la difusión de los fagos a la solución SM. Después, se tomó el volumen necesario para tener entre 100 y 1000 ufp de cada candidato, se llevó a un volumen de 100 μ l de SM y se incubó por 15 min. a 37°C con 200 μ l de un cultivo de *E. coli* XL1 Blue con una D.O. ₆₀₀ =0.5. Posteriormente, se agregaron 4 ml de medio NZY suave previamente fundido y enfriado a 55°C. La mezcla de cada uno de los tubos se agitó suavemente y se depositó sobre las placas de NZY (90 mm de diámetro) y se incubaron toda la noche a 37°C. Finalmente, el DNA de los fagos candidatos se transfirió a filtros de nylon y se híbrido con la sonda, como se indicó anteriormente.

4.7. - Escisión *in vivo* de los fagémidos recombinantes

Después de la segunda purificación de las placas líticas que dieron señal positiva en los filtros por duplicado, los plásmidos contenidos en los fagos recombinantes se escindieron *in vivo*. Las placas líticas se aislaron de las cajas utilizando el diámetro menor de la pipeta pasteur y se colocaron por separado en tubos eppendorf que contenían 500 μ l de SM y 10 μ l de cloroformo, se agitaron en vortex y se incubaron toda la noche a 4°C. Para llevar a cabo la escisión *in vivo*, se mezclaron en tubos cónicos estériles 200 μ l de cultivo de *E. coli* XL1-Blue con una D.O.=0.5, 200 μ l ($\sim 1 \times 10^5$ ufp) de la suspensión de cada una de las clonas candidato en SM y 1 μ l (1×10^6 ufp) del fago "cooperador" R408 (Stratagene). Como control

negativo sólo se mezclaron las células y el fago "cooperador" en ausencia de los candidatos. Los tubos se incubaron 15 min a 37°C, después se les añadió 5 ml de medio 2X YT (NaCl 1%; extracto de levadura 1% y bacto triptona 1.6%) y se incubaron 3 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, las mezclas se calentaron 20 min a 70°C y se centrifugaron a 4000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron, se tomaron 200 µl de éstos y se incubaron con 200 µl de cultivo *E. coli* XL1-Blue, durante 15 min a 37°C. Posteriormente, 100 µl de estas mezclas se espatularon en placas de LB-ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron crecer toda la noche a 42°C. Las colonias que aparecieron en las cajas de Petri contenían el fagémido pBluescript de doble cadena con el inserto clonado. La bacteria infectada solamente con el fago "cooperador" no creció, debido a que es sensible a la ampicilina y el fago presenta una mutación que impide su crecimiento a 42° C.

4.8. - Análisis de las clonas candidato por el método de estrías

Para seleccionar las bacterias que contenían las secuencias amibianas con el gen deseado, las colonias que se obtuvieron de la escisión "*in vivo*" se picaron con palillos estériles y se estriaron por duplicado en placas de LB-ampicilina (100µg/ml) y se incubaron de 7 a 18 h a 37°C. Después las estrías de una de las placas se transfirieron a filtros por duplicado y los filtros de nylon se prehibridarón e hibridarón con la sonda marcada radioactivamente con [α -³²P]-dATP como se indicó anteriormente.

5. - Obtención de DNA de los plásmidos recombinantes

Para continuar con la caracterización de las clonas candidato, las estrías bacterianas que dieron señal positiva se crecieron en medio LB y se hizo la extracción de DNA de plásmido a pequeña escala por el método de lisis por hervido (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello, de un cultivo de toda la noche de bacterias *E. coli* con los plásmidos de interés se tomaron 1.5 ml y se centrifugaron durante 20 segundos a máxima velocidad en una microcentrifuga (Eppendorf). La pastilla bacteriana se resuspendió en 300 μ l de solución STET (NaCl 0.1 M, Tris HCl 10 mM pH 8 y Tritón X-100 al 5%) añadiendo 200 μ g de lisozima (20 μ l de una solución de 10 mg/ml). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 min y se hirvieron a 94 °C durante 2 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 min a máxima velocidad. El sobrenadante conteniendo el plásmido se pasó a un nuevo tubo con cuidado de no tocar la pastilla, se mezcló con 300 μ l de isopropanol frío y se incubó a -20 ° C por 30 min. El DNA se recuperó al centrifugar a máxima velocidad durante 5 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo rápidamente. Finalmente, la pastilla se secó al aire y se resuspendió en 30 μ l de H₂O desionizada. El RNA se eliminó de la preparación de DNA plasmídico por incubación con 10 μ g de RNAsa libre de actividad de DNAsa (Sigma, EUA) a 37°C durante 30 min. El DNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6. - Determinación del tamaño del inserto de las clonas candidato

Para determinar el tamaño del inserto presente en los plásmidos aislados, estos se digirieron durante 2 h a 37°C en un volumen de reacción de 25 µl que contenía: 4 µl de la minipreparación de DNA (~200 ng); 2.5 µl de amortiguador 10X No. 3 (Gibco BRL, EUA), 1 U de la enzima *EcoRI* (Gibco BRL, EUA) y 1 U de la enzima *Xho I* (Gibco BRL, EUA). Las mezclas de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X y posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio, los fragmentos se visualizaron con luz UV y la imagen se registraron en un Gel Doc 1000 (BIORAD).

7. - Secuenciación de DNA de plásmido de doble cadena

La secuencia de los nucleótidos de las clonas candidato se realizaron en el laboratorio de análisis y química de ADN de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala siguiendo el método de terminación de la cadena por incorporación de dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el kit comercial Sequenase Versión 2.0 (USB, EUA). Inicialmente, se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores: 5'-AACAGCTATGACCATG-3' que se localiza a 48 pb río arriba del sitio de corte de *SacI* del vector pBluescript SK (+/-) en dirección 5'-3' y el oligonucleótido 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' a 34 pb del sitio de corte de *KpnI* del vector pBluescript SK (+/-) en dirección 3'-5', (New England, Biolabs). Posteriormente, se utilizaron

oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de las secuencias obtenidas.

El análisis de las secuencias se realizó utilizando programas presentes en la pagina <http://www.expasy.ch> y por comparación en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica* (<http://www.sanger.ac.uk/> y <http://www.tigr.org/>).

8- Determinación del número de copias

Para determinar el número de copias del gen de interés en el genoma de *E. histolytica*, se obtuvo el DNA genómico de trofozoítos de la clona A, y se digirió con enzimas de restricción y los fragmentos generados se hibridarán con las sondas radioactivas de DNA en un ensayo tipo "Southern".

8.1. - Cultivo de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Trofozoítos de la clona A (cepa HM1:IMSS) (Orozco, 1981) se cultivaron axénicamente a 37° C en tubos de 16 x 25 mm en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978) suplementado con suero bovino 16.6% (Biofluids, EUA), previamente inactivado por calor a 56° C durante 30 minutos, mezcla de vitaminas de Diamond 3% (Special Diamond Vitamin Mixture, NortAmerican Biologicals), penicilina 0.25 UI/ml (Lakeside, México) y estreptomycin 35 µg/ml (Lakeside, México). Para sembrar o realizar los experimentos, los trofozoítos en fase logarítmica de

crecimiento se incubaron en un baño de agua-hielo durante 10-15 min y se agitaron suavemente para despegar los trofozoítos de las paredes del recipiente. Se cosecharon por centrifugación a 500 x g durante 7 min a 4° C.

8.2. - Extracción de DNA genómico de amibas

Para obtener el DNA genómico, las amibas primero se cultivaron y se cosecharon como se explicó anteriormente almacenando las pastillas celulares a –70° C hasta obtener aproximadamente 1×10^8 trofozoítos.

Para la extracción del DNA genómico se utilizó el Kit Puregene (Gentra, DNA purification system). Las células congeladas se resuspendieron en 3 ml de solución de lisis y se incubó por 5 min a 37 °C. Después, se dió un tratamiento con 15 µl de RNasa A, el tubo se mezcló por inversión 25 veces y se incubó a 37° por 60 minutos. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó un mililitro de la solución de precipitación de proteínas. Entonces, las muestras se agitaron vigorosamente con vortex por 20 segundos para mezclar uniformemente la solución. Después, se centrifugó a 2000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se le agregó 2 ml de isopropanol al 100%, se mezcló suavemente por inversión 50 veces y se centrifugó nuevamente a 2000 x g por 3 minutos. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó con 3 ml de etanol al 70%, se centrifugó un minuto a 2000 x g, y la pastilla se secó por 10 o 15 min. La pastilla seca de DNA se resuspendió con 250 µl de solución de hidratación y se incubó a 65°C por 1 h. Finalmente, para almacenar el DNA se pasó a un tubo de 1.5 ml y se almacenó a –20 hasta su uso.

8.3. - Digestión enzimática del DNA genómico de *E. histolytica*

El DNA genómico de *E. histolytica* (7.5 µg) se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* (Gibco BRL EUA), *Hind III* (New England Biolabs), *Bgl II* (Gibco BRL EUA), y *Cla I*. (New England Biolabs). Las digestiones se realizaron durante toda la noche en un volumen final de 50 µl, en presencia de los amortiguadores correspondientes y a la temperatura indicada para cada enzima, a la mañana siguiente se agregó una unidad más y se incubó durante dos horas adicionales.

8.4. - Determinación del número de copias del gen por hibridación tipo “southern”

Los productos de digestión del DNA genómico se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y el DNA se visualizó por iluminación con luz UV. Las imágenes de los geles se registraron en un GEL DOC 1000 (Bio Rad). A continuación, el DNA se despurinizó por irradiación con luz ultravioleta por 30 segundos para obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 1 kb y facilitar la difusión eficiente del DNA. Entonces, el DNA se transfirió a filtros de nylon (GeneScreenPlus, New England Nuclear), para lo cual el gel se incubó en solución desnaturizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) durante 45 min en agitación. Después de este tiempo, el gel se lavó con agua desionizada y se incubó en solución neutralizante (NaCl 1 M y Tris-1.5 M, pH 7.4) por 30 minutos. Esta solución se cambió por solución fresca y se incubó por 15

minutos más y finalmente, se lavó en SSC 10X por 15 min. El DNA se transfirió por capilaridad a los filtros de nylon durante toda la noche utilizando como amortiguador SSC 10X de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y col (1989). Al término de la transferencia, la membrana se secó al aire sobre papel filtro y el DNA se fijó a los filtros de nylon por irradiación con luz ultravioleta durante 2 min en un entrecruzador (UV-Stratalinker, Stratagene). Los filtros se prehibridaron e hibridaron con la sonda pPC86-Y marcada con [α - 32 P]-dATP (1.5×10^6 cpm/ml) y las membranas se lavarón como se indicó anteriormente. Los filtros se expusieron a una placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) por dos días en presencia de una pantalla intensificadora.

VII Resultados

1 Aislamiento de la sonda

Experimentos realizados por Karina Picazarri durante su tesis de Maestría, utilizando el sistema de doble híbrido sugieren que el extremo carboxilo de una proteína amibiana que llamó PC86-Y interacciona con la proteína *EhRabB* (Picazarri, 2001). Sin embargo, la secuencia aislada por Picazarri corresponde a un fragmento de 372 pb que no permitió identificar a la proteína. Por otra parte, la búsqueda de esta secuencia en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica*, el cual al momento de iniciar este trabajo no estaba completo, no dio resultados positivos. Por tal motivo, en este trabajo nos propusimos aislar el gen completo de este candidato para tratar de caracterizar estructuralmente la proteína con posible interacción con *EhRabB*.

Para ello realizamos el tamizaje de una genoteca de cDNA de *E. histolytica* utilizando como sonda el fragmento de 372 pb clonado en el vector pPC86. Para aislar dicho fragmento, lo primero que se realizó fue la digestión del plásmido pPC86-Y con las enzimas de restricción *NotI* y *SalI*. El análisis electroforético, de esta digestión mostró dos bandas de DNA de aproximadamente 2900 y 350 pb (Figura 3, carril 3), mientras que la digestión del vector pPC86-Y con las mismas enzimas solo produjo la banda de 2900 pb (Figura 3, carril 4), indicando que la banda de 350 pb corresponde al cDNA amibiano.

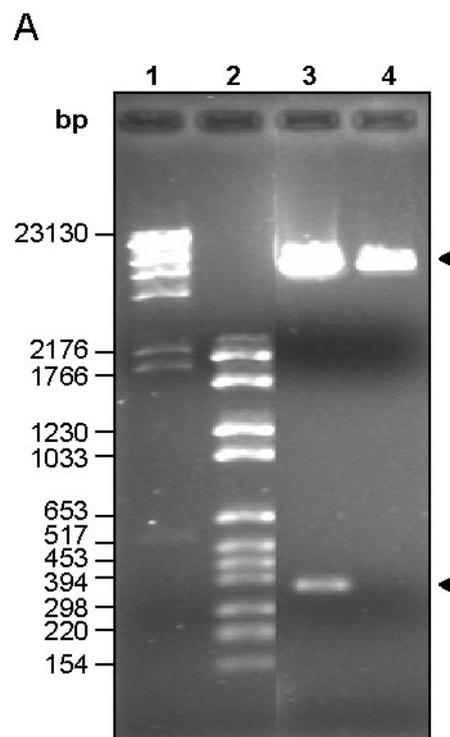


Figura 3. Digestión del plásmido pPC86-Y. El plásmido fue digerido con las enzimas *Sal I* y *Not I* y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1%: Carril 1, DNA del fago λ digerido con la enzima *Hind III*. Carril 2, marcador de peso molecular # VI. Carril 3 plásmido digerido con las enzimas de restricción. Carril 4, vector pPC86 digerido con las mismas enzimas. Las cabezas de flecha indican las bandas de 2900 y 350 pb producto de la digestión.

Posteriormente, la banda de 350 pb se purificó utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen). Después del proceso de purificación, el DNA aislado se analizó en geles de agarosa al 1% (datos no mostrados), posteriormente la banda de 350 pb se marcó radioactivamente con [^{32}P] αdATP y se utilizó como sonda en el escrutinio de un banco de cDNA de *E. histolytica* construido en el fagemido λZap (Sánchez *et al.*, 1994).

2 Tamizaje de un banco de cDNA

Después del primer rastreo se identificaron cinco clonas candidatos que dieron señal positiva por duplicado en los filtros de nylon cuando se hibridaron con la sonda radioactiva de PC86-Y (Figura 4). Con el fin de purificar los candidatos, de las cajas de Petri se obtuvieron las regiones correspondientes a las señales positivas. Los fagos se resuspendieron en solución SM y de 100 a 1000 unidades formadoras de placas se plaquearon en cajas de Petri, para repetir el procedimiento de hibridación con la sonda .

En este tamizaje secundario, algunos fagos provenientes de cuatro de las cinco señales positivas iniciales, hibridaron nuevamente con la sonda (Figura 5), indicando que estos fagos contenían el gen de interés y solo la señal del candidato número 3 resultó ser un falso positivo pues no hubo hibridación en el segundo tamizaje.

Los cDNAs amibianos están contenidos en el vector $\lambda\text{zap II}$, el cual es un fagemido que contiene en su genoma al plásmido pBluescript (Invitrogen). Esto permite que mediante la ayuda de un fago cooperador, el plásmido pueda

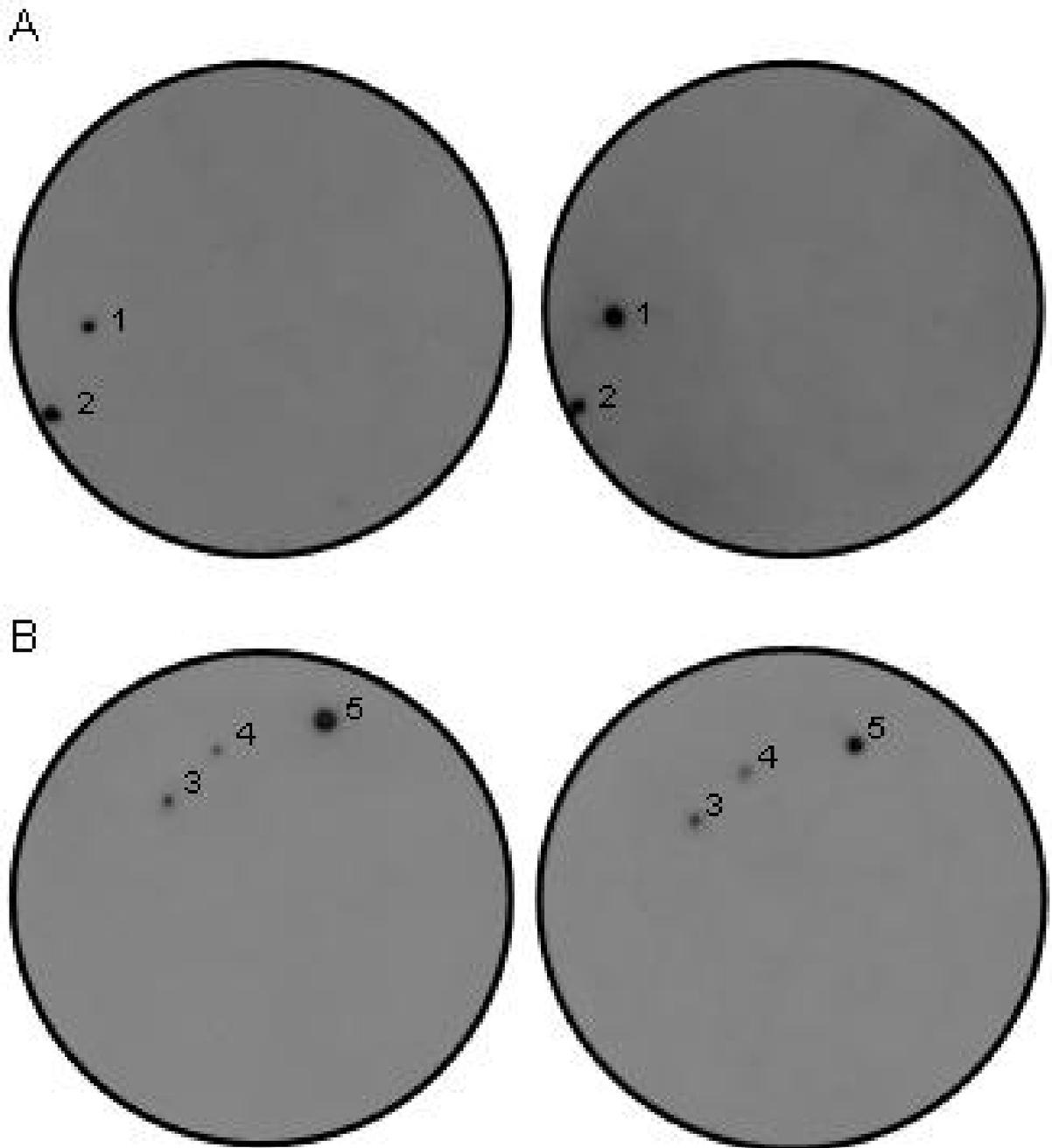


FIGURA 4. Primer tamizaje de la genoteca de cDNA. El cDNA purificado del plásmido pPC86-Y se marcó radioactivamente y se utilizó como sonda en un banco de cDNA de *E. histolytica*. En la figura A se muestra la placa autorradiográfica con las señales de los candidatos 1 y 2. La figura B muestra las placas autorradiográficas con las señales positivas de los candidatos 3,4 y 5. Los números indican las señales positivas obtenidas.

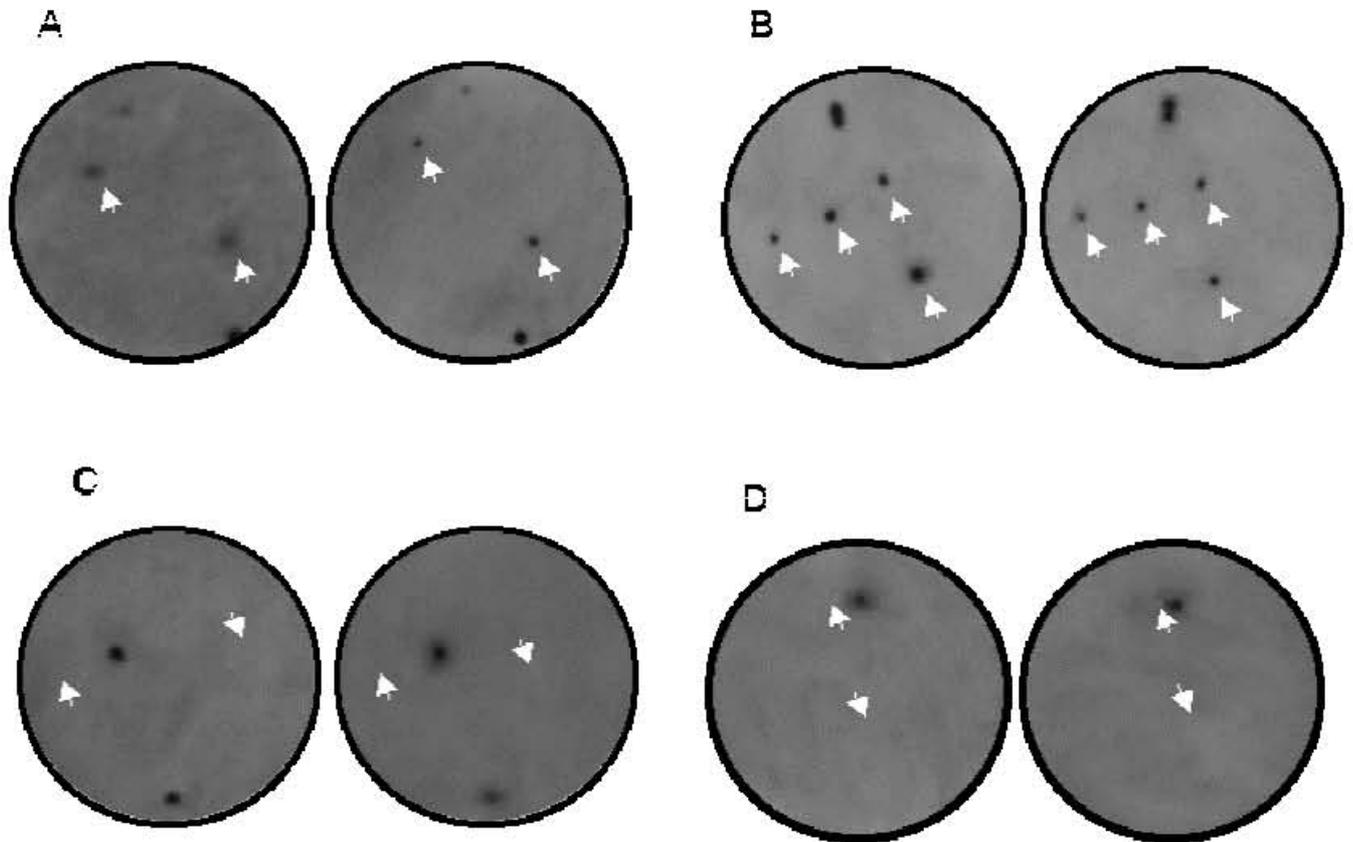


Figura 5 Segundo tamizaje de la genoteca de cDNA. Los fagos que dieron señal positiva en el primer tamizaje se aislaron para poder purificar el fago con el fragmento de DNA de interés. Las placas líticas fueron hibridadas nuevamente con la sonda PC86-Y. (A) Señales por duplicado de los fagos aislados del candidato 1 del primer tamizaje. (B) Señales positivas de los fagos aislados del candidato 2 del primer tamizaje. (C) Señales positivas de los fagos aislados del candidato 4 del primer tamizaje. (D) Señales positivas por duplicado de los fagos aislados del candidato 5 del primer tamizaje. Las flechas muestran algunas de las señales positivas obtenidas por duplicado .

obtenerse del fago por un procedimiento denominado escisión *in vivo*. Dado que los cDNAs ambientales se clonaron dentro de la secuencia de pBluescript, la escisión *in vivo* nos permite obtener y caracterizar a los genes de interés en el plásmido.

Para verificar que las bacterias aisladas después de la escisión *in vivo* contenían los plásmidos con el cDNA de interés se hicieron estrías con diferentes colonias de bacterianas candidatas. Posteriormente, las estrías de las bacterias se transfirieron a filtros de Nylon, se lisaron y el DNA de éstas se hibridó nuevamente con la sonda de 350 pb. En estos experimentos se encontró que la mayoría de los candidatos hibridaron con la sonda (Fig. 6), confirmando que los plásmidos que tienen estas bacterias contienen el gen de interés. En estos experimentos se utilizaron como control negativo bacterias con el plásmido pBluescript con un inserto no relacionado, el cual no dio señal (Figura 6, flechas indicando la especificidad de la hibridación).

Una vez confirmada la hibridación de la sonda con los candidatos, se procedió a aislar los plásmidos recombinantes a partir de una colonia representativa de cada uno de los 4 candidatos originales. Después de obtener los plásmidos, éstos se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para liberar los insertos de cDNA ambientales del vector pBluescript. El análisis electroforético de las digestiones mostró que cada candidato contenía insertos de aproximadamente 1800, 1550, 1400 y 770 pb (Fig. 7), sugiriendo la presencia de diferentes genes o diferentes fragmentos de un mismo gen.

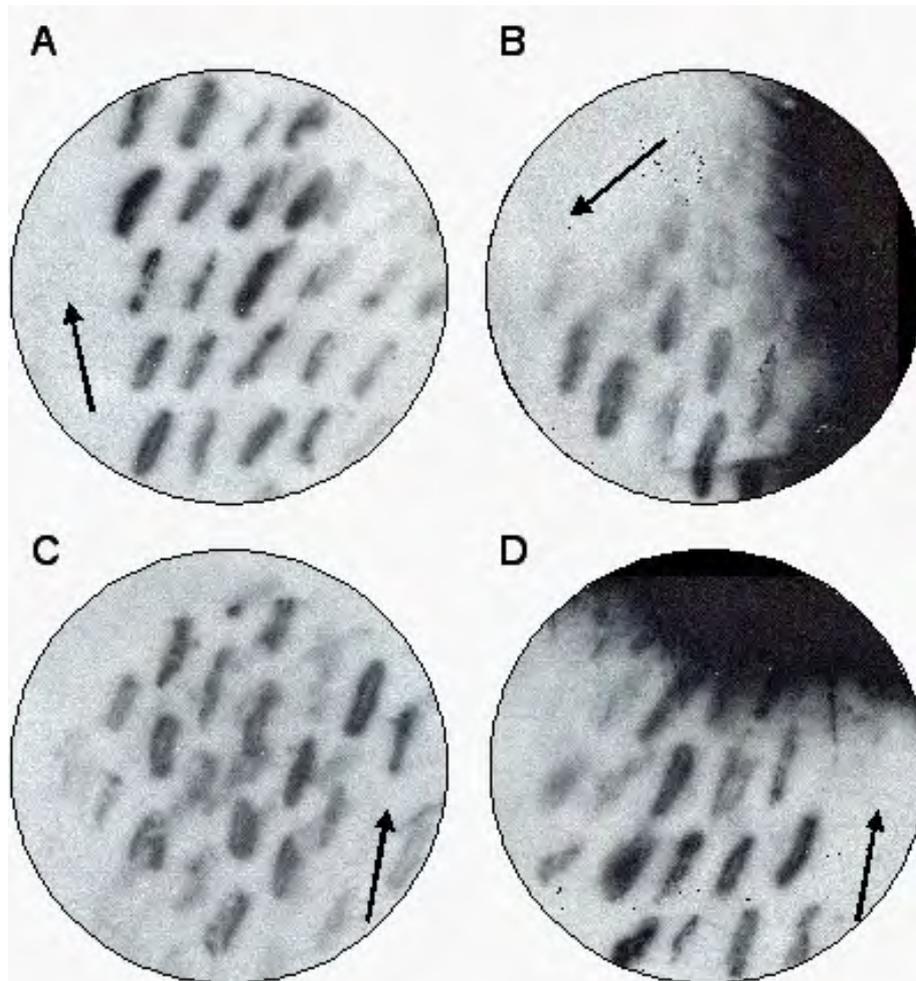


Figura 6. Hibridación de las estrias bacterianas con el fragmento PC86-Y. Estrias de diferentes colonias bacterianas que contenían el DNA de los candidatos 1, 2, 4 y 5 se lisaron y su DNA se transfirió a membranas de nylon (Figuras A,B,C,D, respectivamente) donde se hibridó con el fragmento PC86-Y marcado con ^{32}P . Como control negativo se utilizó un fragmento contenido en bacterias que no tenía relación con el DNA de PC86-Y indicado con las flechas.

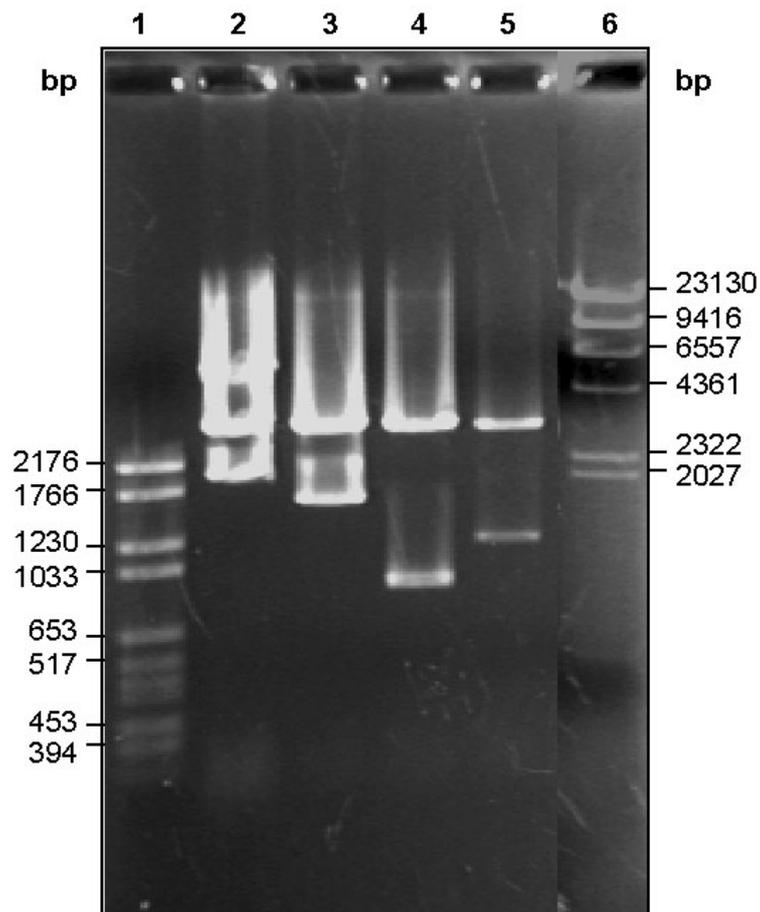


Figura 7. Digestión de los candidatos obtenidos en el tamizaje. Una vez aislado el DNA plasmídico de los 4 candidatos, éste se purificó y se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Posteriormente, los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de tamaño molecular número VI. Carril 2, Candidato número 2 . Carril 3, candidato 4. Carril 4, candidato número 5. Carril 5, candidato número 1. Carril 6 DNA del fago λ digerido con *Hind III* como marcador de tamaño molecular.

3 Caracterización de los candidatos

Con el fin de determinar si los candidatos corresponden a diferentes genes o a diferentes segmentos del mismo gen, el DNA de estos candidatos se mandó secuenciar al Laboratorio de Análisis y Química de ADN de la FES Iztacala en el Secuenciador Modelo ABI Prism BigDye Terminator chemistry.3100 (Genetic analyser). El análisis de las secuencias reveló que los cuatro candidatos correspondían al mismo gen pero con diferentes longitudes ya que todos ellos presentaron secuencias idénticas hacia su extremo 3'. A su vez la secuencia de la clona PC86-Y también estaba contenida en los candidatos (Figura 8), confirmando que los candidatos aislados corresponden al gen de interés. Un resultado interesante fue que el candidato 2.1 mostró la secuencia del gen interrumpido por 947 pb. Además, este elemento está flanqueado por secuencias repetidas cortas directas (Figura 9), características de los sitios de inserción de los transposones y esta secuencia presenta un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido con 98% de identidad a transposones de diferentes organismos. Esta secuencia de inserción puede provenir del genoma de la ameba o de la bacteria donde se introdujeron los plásmidos que contienen el gen de interés. Para poder saber el origen de esta secuencia, se realizaron ensayos de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia de inserción y como molde, DNA de ameba o DNA de la bacteria sin plásmido alguno. En esos ensayos se amplificó un fragmento de DNA del tamaño esperado (1000 pb) cuando se utilizó al plásmido 2.1 ó el DNA bacteriano como DNA molde (Fig. 10, carriles 4,6), pero no cuando se utilizó el DNA amebiano como DNA molde (Figura 10, carriles 2,5).

ACTCTTATTG	ACAACAATAT	CAAAAATTGG	ATTTTTCTT	CTTTTCATTG
TTTTTGAGT	TCTTGTGTT	ATAGCTCTTT	TTGTTAGTTT	AAATGCACCA
AAACCATGGT	CAACAAATGA	AATAAGTTCA	TGGAAATGTG	CTGGTGATGA
TGCACAATTT	AATCAAAATT	GTGGGGGAGT	AAATTTGTTA	GATAAATCCA
AAAAATAAC	TCTTCAATTA	GGTGCATATG	AAATTTTTAA	TCAAGAGTCT
CGTTTAGAAT	ATTATTTCAA	TAAAAAGAGT	TCTAAGAAAG	ATATTGCCTT
TGATGGATTT	GTCAAATTTA	GATATACATT	ATATGGAAGT	AATGTATTAA
ATCAACCCAA	CCAAAAAGTT	GAAGTAAGTT	CATTAAAAGT	TATTGAAGAA
AAAACAATTG	AAAGTAAAGT	ACATTGTCCA	GCTAGATCTA	CCAAATGTGA
TATTGGTTAT	ATCTCATCAG	AACTGTATTT	AGATTATCCA	ATTTATATTA
TTGAAATTTT	TATAATTAAT	GAAAATGTAA	AAGATATTGT	TAGTGATCTT
ATCTTTAAAG	CATCATTTGT	TTCAACGTTT	TATACTATTT	TTGAATTATT
CTGGAGACTT	ATTTTTATTT	TATTCTCTTG	TTTGIGTACT	TGTATTTATC
TTTGGGCTAA	TAGATCCATT	CCACAAGAAA	AATGGAGTCA	TGAACAAAAG
TGGACAGTTG	TATTATTAAC	ATTCCTTATT	TGGGAAAATA	ATCCATTATA
TCCATATGAA	TTTTTAATGG	ATAATGCTTT	CTATTTATTT	GTAAATTCTG
TTATTGATAC	TATTTTCATA	TGTTTCTTAA	TGTTTTATGT	TCTTATTATG
TTTGATGCAT	TAAGAAAACC	AATTCGACAA	AGAACAAGTA	TTCGATTCTA
TTTACCAAGA	GGTTTATTGT	GTGGTTTATT	ATTTTCACTT	ATTTTAGCAT
CATTCATGTA	TAACAAAACA	AGAAAGATTT	ATTCACCTAC	AATGACTGGT
TCACATGATG	TATTTAATGT	TATTATTTCA	TTAGGTATTA	TGGGTCTATT
AATTATTTAT	TTATTCTGGT	TAATATTCTC	TATTATTCGT	TCATTCTCAG
AAGTTCGTAA	ATTAGGAAGT	GCTGGTTATA	GAGTTCAGT	CTATGGTATT
TTCACATCT	TCATTTTATT	ATTCTATGTC	TCATTATTAC	TTTCAGTATT
<u>CTTTATGGGT</u>	<u>TATCGTAATA</u>	<u>ATGCTGCTGT</u>	<u>TTCTTTAACA</u>	<u>ACTATTGCAT</u>
<u>TTGTTAATTT</u>	<u>CTATTGTATG</u>	<u>GTTTTGACTA</u>	<u>TCCTTTACTT</u>	<u>ACCATCAAAT</u>
<u>GTTGTTGACC</u>	<u>AAAAAGAGGA</u>	<u>GAGAGCTAAA</u>	<u>ATTGTTAAAT</u>	<u>TGGATGATGA</u>
<u>TGAAGCTTTA</u>	<u>GAGTTAAAAG</u>	<u>TAGAAGATTA</u>	<u>TGATAATGAA</u>	<u>GAGTCTCATG</u>
<u>GAGATGAAGT</u>	<u>GGTAATTGCA</u>	<u>GATGATGAAA</u>	<u>ATTAAATTTT</u>	<u>CTTCTTCTTT</u>
<u>CAAATTAAT</u>	<u>TCCTTCTTGC</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>

Figura 8. Secuencia de los candidatos. Los 4 candidatos obtenidos por el tamizaje de cDNA de *E. histolytica* corresponden a diferentes tamaños de un mismo gen. Las secuencias encerradas en cuadros representan el extremo 5' de los diferentes candidatos. La flecha indica el sitio donde se incorpora un trasposon en el candidato 2.1. La secuencia subrayada indica fragmento obtenido en ensayos de doble híbrido (Picazarri, 2001).

ATAAATAATTAATAGA **CCCATAATAC** TCGTCGAAATCGCCGTAATTCATTTATCAAATC
 ATTAAGTTAAGGTAGATACACATTCTTGTTCATATGATCAAATGGTTTCGCCAAATCAATA
 ATCAGACAACAAA**ATG**TGCGAACTCGATATTTTACACGACTCTCTTTACCAATTCTGCC
 M C E L D I L H D S L Y Q F C P 16
 CGAATTACACTTAAAACGACTCAACAGCTTAACGTTGGCTTGCCACGCCTTACTTGACTG
 E L H L K R L N S L T L A C H A L L D C 36
 TAAACTCTCACTCTTACCGAACTTGGCCGTAACCTGCCAACAAAGCGAGAACAAAACA
 K T L T L T E L G R N L P T K A R T K H 56
 TAACATCAAACGAATCGACCGATTGTTAGGTAATCGTCACCTCCACAAAGAGCGACTCGC
 N I K R I D R L L G N R H L H K E R L A 76
 TGTATACCGTTGGCATGCTAGCTTTATCTGTTTCGGCAATACGATGCCCATTTGACTTGT
 V Y R W H A S F I C S G N T M P I V L V 96
 TGACTGGTCTGATATCCGTGAGCAAAAACGGCTTATGGTATTGCGAGCTTCAGTCGCACT
 D W S D I R E Q K R L M V L R A S V A L 116
 ACACGGTCGTTCTGTTACTCTTTATGAGAAAGCGTTCCCGCTTTCAGAGCAATGTTCAA
 H G R S V T L Y E K A F P L S E Q C S K 136
 GAAAGCTCATGACCAATTTCTAGCCGACCTTGCAGCATTCTACCGAGTAACACCACACC
 K A H D Q F L A D L A S I L P S N T T P 156
 GCTCATTGTCAGTGATGCTGGCTTTAAAGTGCCATGGTATAAATCCGTTGAGAAGCTGGG
 L I V S D A G F K V P W Y K S V E K L G 176
 TTGGTACTGGTTAAGTCGAGTAAGAGGAAAAGTACAATATGCAGACCTAGGAGCGGAAAA
 W Y W L S R V R G K V Q Y A D L G A E N 196
 CTGAAACCTATCAGCAACTTACATGATATGTCATCTAGTCACTCAAAGACTTTAGGCTA
 W K P I S N L H D M S S S H S K T L G Y 216
 TAAGAGGCTGACTAAAAGCAATCCAATCTCATGCCAAATTCTATTGTATAAATCTCGCTC
 K R L T K S N P I S C Q I L L Y K S R S 236
 TAAAGGCCGAAAAAATCAGCGCTCGACACGGACTCATTGTCACCACCCGTCACCTAAAT
 K G R K N Q R S T R T H C H H P S P K I 256
 CTACTCAGCGTCGGCAAAGGAGCCATGGATTCTAGCAACTAACTTACCTGTTGAAATTCCG
 Y S A S A K E P W I L A T N L P V E I R 276
 AACACCCAAACAACCTTGTTAATATCTATTTCGAAGCGAATGCAGATTGAAGAAACCTTCGG
 T P K Q L V N I Y S K R M Q I E E T F R 296
 AGACTTGAAAAGTCCTGCCTACGGACTAGGCCTACGCCATAGCCGAACGAGCAGCTCAGA
 D L K S P A Y G L G L R H S R T S S S E 316
 GCGTTTTGATATCATGCTGCTAATCGCCCTGATGCTTCAACTAACATGTTGGCTTGCGGG
 R F D I M L L I A L M L Q L T C W L A G 336
 CGTTCATGCTCAGAAACAAGTTGGGACAAGCACTTCCAGGCTAACACAGTCAGAAATCG
 V H A Q K Q G W D K H F Q A N T V R N R 356
 AAACGTAICTCAACAGTTCGCTTAGGCATGGAAGTTTTGCGGCATTCTGGCTACACAAT
 N V L S T V R L G M E V L R H S G Y T I 376
 AACAGGGGAAGACTTACTCGTGGCTGCAACCCTACTAGCTCAAATTTATTACACATGG
 T R E D L L V A A T L L A Q N L F T H G 396
 TTACGCTTTGGGGATTTATCGCCGATCTCTCAG **CCCATAATAC** CTAATGAAATAAT
 Y A L G K L * 402

Figura 9. Secuencia de inserción en el candidato 2.1. La secuenciación del candidato 2.1 reveló una secuencia de inserción (IS) entre el gen de interés. Las cajas indican los repetidos directos cortos característicos de los sitios que flanquean a los IS. Las flechas indican los iniciadores que se utilizaron en ensayos de PCR. Los números indican la posición de aminoácidos del marco de lectura abierta con homología a transposasas.

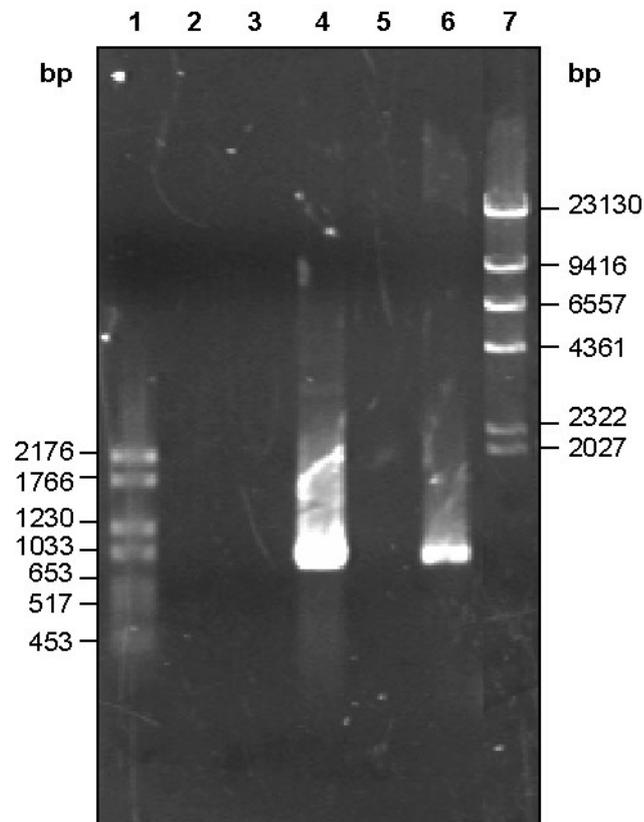


Figura 10. Amplificación del IS. Utilizando como iniciadores oligonucleotidos presentes en el IS y diferentes DNAs como molde se realizaron ensayos de PCR. Posteriormente, los productos de reacción se analizaron en geles de agarosa al 1%. Carril 1l, marcadores de tamaño molecular número VI. Carril 2, PCR utilizando DNA total de ameba de la clona A. Carril 3, ensayo sin DNA molde como control negativo. Carril 4, PCR utilizando como molde DNA del candidato 2.1. Carril 5, PCR utilizando como molde DNA total de ameba clona L-6. Carril 6 PCR utilizando como molde DNA total de bacteria cepa XL1Blue. Carril 7, DNA del fago lambda digerido con *Hind*III como marcador de tamaño molecular.

Este resultado indicó que la secuencia es de origen bacteriano y que ésta se incorporó antes o durante el proceso de escrutinio.

Así, eliminado el candidato que contenía el elemento IS, el fragmento de mayor tamaño aislado corresponde a 1550 pb, en el cual al hacer la traducción mostró la presencia de un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de 450 aa. Sin embargo, en éste no se encontró el codón de inicio de la traducción, indicando que en este candidato no está presente el extremo 5' del gen. Para obtener la secuencia faltante del gen, las primeras 50 bases de la secuencia obtenida fueron utilizadas como sonda en la búsqueda de la secuencia faltante en la base de datos del proyecto genoma de *E. histolytica*.

Mediante el análisis por BLAST, se identificó la secuencia con numero Ent1058h02.g1c, en la cual se identificaron varias secuencias que sugieren que en esta clona se encuentra el extremo 5' del gen. En primer lugar encontramos que no existía un marco de lectura abierto continuo en toda la secuencia (Figura 11), 18 nucleótidos río arriba del primer codón ATG se localizaron dos secuencias con homología a las secuencias reportadas como sitios de inicio de la transcripción de *E. histolytica* (Inr) (Figura 11) (Bruchaus y col, 1993). Además 50-60 bases río arriba de estos sitios se localizó una secuencia correspondiente a la caja TATA de *E. histolytica* "tatttaaa" (Figura 11) (Bruchaus y col, 1993). Estos datos sugieren que a la clona mayor aislada en este trabajo solo le faltaron 41 nucleótidos para tener toda la secuencia codificante del gen.

SECUENCIA DEL SANGER

```

atTTTTTTgagaatgaatcacaaaaaatagagttgaaaaagggtttttttatttaaaaa
I F L R M N H K K - S - K R V F L F K K
aaagaaaaaagtattacaaaaaaagtcaaaaaaaaaaaagaacttgaaaacttcaaatatg
K E K S I T K K V K K K K N L K T S N M
aacaattctggggtgttaaacacaaacaaagaacagagactcttattgacaacaatatca
N N S G V L N T N K E Q R L L L T T I S
aaaattggatttttccttcttttca
K I G F F L L F

```

Figura 11. Secuencia 5' del gen PC86-Y. Con la secuencia obtenida mediante secuenciación de los candidatos se hizo un análisis tipo BLAST en la base de datos del genoma de *E. histolytica*, la cual dió como resultado la secuencia Ent1058h02.q1c. La secuencia en recuadro indica la secuencia con homología a la secuencia reportada como la caja TATA de *E. histolytica*. En negrillas se representan dos posibles secuencias Inr. La secuencia subrayada indica el extremo 5' de la clona de cDNA mas larga aislada en este trabajo.

Una vez unida la secuencia Ent1058h02.g1c y la secuencia de los candidatos se hizo la traducción de nucleótidos a aminoácidos mediante el programa Translate en la página web ExPASy (Expert Protein Analysis System) confirmando que no se rompía el marco de lectura abierto.

Esta secuencia mostró la presencia de un marco de lectura abierto codificando un polipéptido de 491 aa (Figura 12). El análisis de esta secuencia mostró que el polipéptido predicho tiene un punto isoeléctrico de 5.97 y una masa de 56930.51 daltones. Por otro lado el análisis *in silico* predijo la presencia de 7 hélices transmembranales (figura 13) además de varios motivos de fosforilación y un dominio de N-glicosilación en la asparagina 324 (Tabla II). Además, el análisis por BLAST en la base de datos del Gene Bank/EMBL reveló que la proteína PC86-Y tiene una homología de 37 a 46% de identidad con proteína con función desconocida de humano , ratón, *Drosophyla melanogaster* y *Anopheles gambiae*. Estas proteínas comparten la presencia de dominios transmembranales (datos no mostrados), la cual es un característica de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés; G protein- coupled receptors), implicadas en transducción de señales (Tabla III).

MNNSGVLNTN	KEQRLLTTI	SKIGFLLFI	VFAVLVIAL	FVSLNAPKPW	50
STNEISSWKC	AGDDAQFNQN	CGGVNLLDKS	KKITLQLGAY	EIFNQESRLE	100
YYFNKKSSKK	DIAFDGFVKF	RYTLYGTNVL	NQPNQKVEVS	SLKLIEEKTI	150
ESKVHCPARS	TKCDIGYISS	ELYLDYPIYI	IEISIINENV	KDIVSDLIFK	200
ASFVSTFYTI	FELFWRLIFI	LFSCLCTCIY	LWANRSIPQE	KWSHEQKWTV	250
VLLTFLIWEN	NPLYPYEFLM	DNAFYLFVNS	VIDTIFICFL	MFYVLIMFDA	300
LRKPIRQRTS	IRFYLPGRLL	CGLLFSLILA	SFMYNKTRKI	YSPTMTGSHD	350
VFNVIISLGI	MGLLLIYLFW	LIFSIIRSFS	EVRKLGSAI	RVQVYGIFTI	400
FILLFYVSLI	LSVFFMGYRN	NAAVSLTTIA	FVNFYCMVLT	ILYLPSNVVD	450
QKEERAKIVK	LDDDEALELK	VEDYDNEESH	GDEVVIADDE	N	491

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína PC86-Y. La unión de la secuencia de los candidatos y de la clona identificada en la base de datos se logró obtener una secuencia que al ser traducida por medio del programa Translate de la página WEB Expasy.org reveló un polipéptido de 491 aminoácidos.

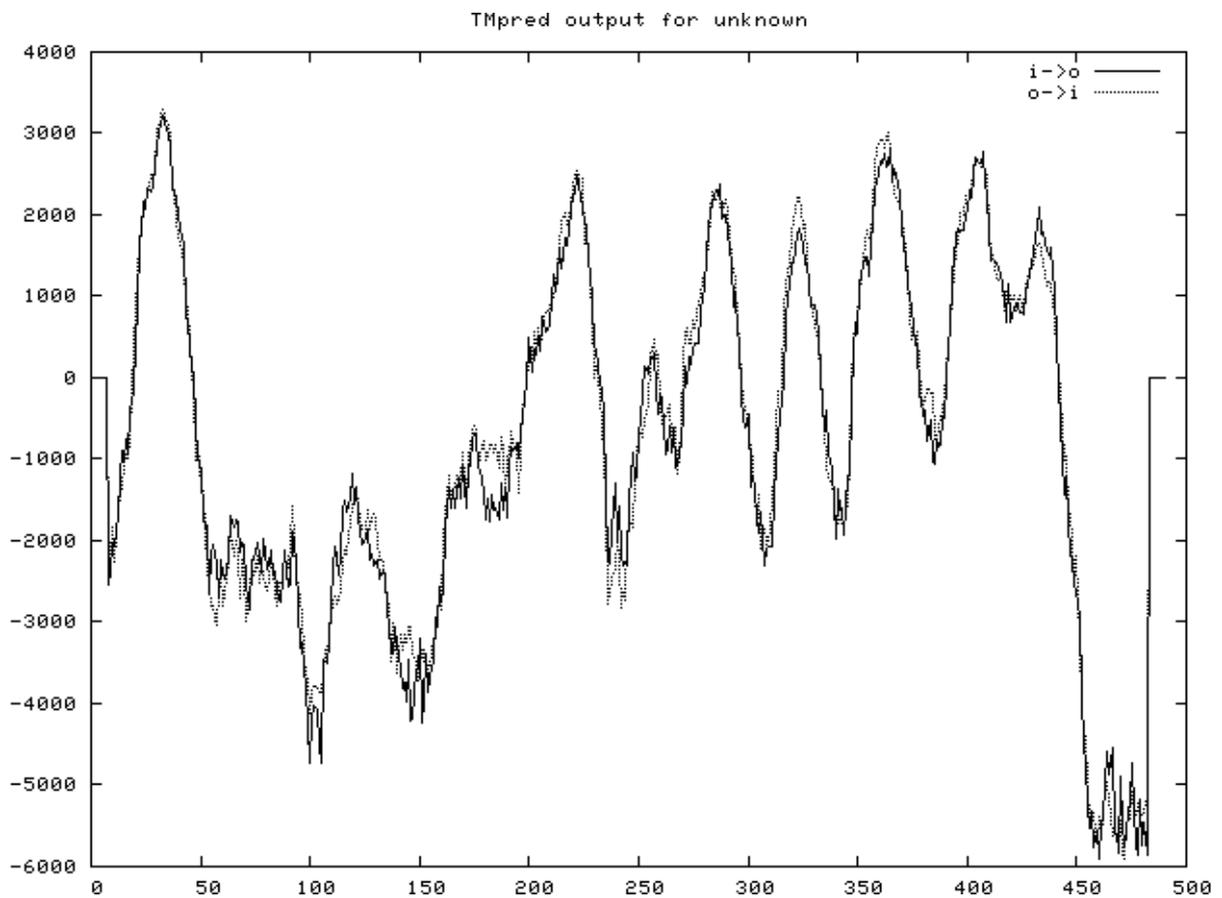


Figura 13. Análisis de hélices transmembranales. Con la secuencia completa de aminoácidos se metió en el programa TmPred de la página expasy.org, se obtuvieron siete regiones transmembranales.

TABLA II Dominios presentes en la proteína pPC86-Y

<i>POSICIÓN</i>	<i>DOMINIO</i>	<i>SECUENCIA CONCENSO</i>	<i>SECUENCIA EN PC86-Y</i>
9-11, 57-58, 80-82, 107-109, 141-143, 160-162, 310-312, 337-339.	Sitio de fosforilación por proteína cinasa C	[ST]-X-[RK]	TNK,SW,SSK,NQP,STK,NNP,KTR.
81-84,105-108	Sitio de fosforilación por proteína cinasa dependiente de cAMP y cGMP	[rk](2)-X[ST]	KKIT, KKSS
9-12, 51-54, 97-100, 108-111, 161-164, 209-212, 280-283, 378-381, 479-482.	Sitio de fosforilación por caseína cinasa II	[ST]-X(2)-[DE]	TNKE,STNE,SRLE,SKKD,ESKV,TIFE,VID,L FWL,LKVE
234-237	Sitio de N- Glicosilación		NRSI

TABLA III Proteínas homólogas a la proteína identificada de *E. histolytica*

<i>ORGANISMO</i>	<i>PROTEÍNA</i>	<i>HOMOLOGÍA</i>	<i>FUNCIÓN</i>
<i>D. melanogaster</i>	CG13409-PA	41% en 303 aa	Desconocida
<i>A. gambie</i>	Ensangp	46% en 303 aa	Desconocida
<i>H. sapiens</i>	OTTHUMP	37% en 346 aa	Desconocida
<i>M. musculus</i>	MKIAA1423	42% en 167 aa	Desconocida
<i>B. floridanus</i>	Putativa proteína de unión a GTP	48% en 46 aa	Desconocida
<i>F. nucleatum</i>	Heteropolisacarido repetido de la unidad de exportación de proteína.	43% en 132 aa	Desconocida

4 Número de copias del gen

Para conocer el número de copias del gen pPC86-Y, en el genoma de *E. histolytica* se realizaron ensayos tipo Southern. Así el DNA genómico se digirió con las enzimas *EcoRI*, *BglII*, *Clal* y *HindIII*. La hibridación de la sonda dio como resultado una sola banda de 23000, 11843 y 3000 pb en el DNA digerido con las enzimas *BglII*, *Clal* y *HindIII* respectivamente. Sin embargo, la sonda identificó dos bandas de 8714 y 4803 pb en el DNA digerido con la enzima *EcoRI* (Figura14). Dado que la sonda utilizada no tiene sitio de corte para esta enzima, este resultado indica que existen al menos dos copias del gen en el genoma de *E. histolytica*.

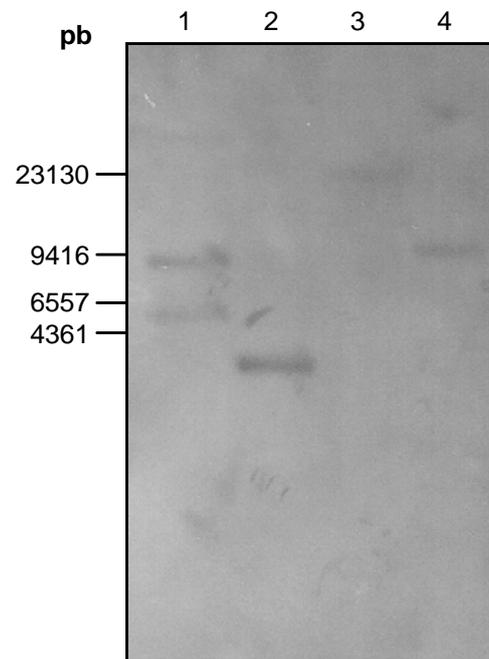


Figura 14. Identificación del número de copias del gen en el genoma de *Entamoeba histolytica*. El DNA genómico del parásito fue digerido con diferentes enzimas de restricción, los productos de la digestión fueron separados por electroforesis, transferidos a nylon e hibridados con la sonda pPC86-Y. Carril 1 DNA digerido con *EcoRI*. Carril 2 DNA digerido con *HindIII*. Carril 3 DNA digerido con *BglII*. Carril 4 DNA digerido con *Cla I*.

VIII Discusión

Las células eucariontes contienen un dinámico grupo de compartimentos membranales que son responsables del empaquetamiento y reciclamiento de proteínas y otras moléculas (González, Jr. and Scheller, 1999). Este proceso es altamente regulado por las proteínas Rab (González, Jr. and Scheller, 1999). En *E. histolytica* se han identificado varias proteínas pertenecientes a la familia Rab entre las que se encuentra EhRabB la cual parece participar en la fagocitosis, un evento de patogenicidad de este parásito (Rodríguez *et al.*, 2000). La función de las proteínas Rab son estrechamente reguladas por otras proteínas que controlan su unión a vesículas, la unión e hidrólisis de GTP y el movimiento y fusión de las vesículas con el organelo blanco (González, Jr. and Scheller, 1999). Probablemente EhRabB tiene una regulación similar, por lo que la identificación de estas proteínas sería importante para el estudio de la regulación de la fagocitosis de este parásito.

En nuestro laboratorio mediante el sistema de doble híbrido se obtuvo una proteína que en levaduras interactúa con *EhRabB*, aunque ésta se encontró incompleta hacia el extremo amino (Picazarri, 2001). En el presente trabajo se planteó como objetivo obtener el gen completo de la proteína que interactúa con *EhRabB* de una genoteca de cDNA para tratar de conocer la identidad de la proteína a partir del análisis *in silico*. El escrutinio en un banco de cDNA de *E. histolytica* dió como resultado el aislamiento de cuatro clonas que contenían fragmentos del mismo gen (Figura 4). Aunque, no se obtuvo el gen completo.

La secuencia obtenida mediante un BLAST con numero Ent1058h02.g1c permitió obtener el extremo 5' de la secuencia y de esta manera ubicar el ATG correspondiente de este. La comparación de otros genes amibianos ha permitido observar que este protozooario contiene una organización genómica diferente a otros eucariontes. En general presentaregiones 5' cortas y la transcripción comúnmente comienza con las siguientes secuencias "ATTCA" o "ATCA" además de una caja TATA poco común que puede contener la siguiente secuencia "TATTTAAA" (Bruchhaus *et al.*, 1993). En la secuencia Ent1058h02.g1c pudimos observar esa secuencia sugiriendo que se tiene identificada toda la secuencia del gen. Por otro lado el genoma de la amiba se decía que tenia como característica ser escaso de intrones, sin embargo recientemente se ha observado que los intrones se encuentran en el 15 % de los genes que codifican para proteínas (Mann, 2002). En el análisis hecho en banco de datos del proyecto genoma *E. histolytica* se encontró que el gen aislado esta codificado por un gen que presenta un intron (datos no mostrados).

Una vez obtenida la secuencia completa se hizo la traducción a aminoácidos y mediante el programa TMPRED ubicado en la pagina del Expasy. org se obtuvo que la proteína tiene siete asas transmembranales. Cuando existen múltiples dominios transmembranales, un numero impar significa que ambos extremos terminales de la proteína están en lados opuestos de la membrana. Un tipo común de estructura es aquel que consta de siete dominios transmembranales (Figura 13) comúnmente denominado receptor en serpiente. Los dominios transmembranles son importantes en la función de las proteínas que hacen múltiples pases a través de la membrana pues suelen

contener residuos polares que no interactúan con la membrana, pero crean un túnel entre sus dominios formando poros o canales. Otro caso en el la conformación de los dominios transmembranales son importantes lo proporcionan ciertos receptores que se unen a ligandos lipofílicos, en este caso los dominios transmembranales se unen al ligando en el interior del plano de la membrana (Lewin B., 2001). La gran familia de receptores de superficie transmiten señales a blancos intracelulares vía la acción intermediaria de proteínas de unión al nucleótido guanina. Los receptores acoplados a proteínas G están estructural y funcionalmente relacionados, se caracterizan por tener siete asas transmembranales (Geoffrey, 2000). La unión de ligandos al dominio extracelular de estos receptores induce un cambio conformacional en el dominio citosólico de el receptor asociado a proteínas G en la membrana interna. Esta interacción activa las proteínas G que después se separa de receptor y lleva una señal a un blanco intracelular, el cual puede ser una enzima o un canal (Geoffrey, 2000).

La activación de las vías de señalización en la amiba se han comenzado a estudiar recientemente y su entendimiento aun no es claro. Sin embargo, se ha demostrado la expresión de proteínas G funcionales y su participación en los mecanismos de transducción de señales (Paveto *et al.*, 1999). Por ejemplo, se ha sugerido que la vía de activación por la proteína cinasa C es activada en las amibas como resultado de la unión de los trofozoítos a fibronectina, la cual induce un cambio conformacional del citoesqueleto por el receptor superficial que está asociado al citoesqueleto (Santiago *et al.*, 1994).

El análisis de la proteína codificada por el gen pPC86-Y también mostró varios posibles dominios de fosforilación y al encontrarse ésta en la membrana

plasmática con una conformación transmembranal, muy probablemente este interactuando sus dominios extracelulares con un ligando desconocido y con su dominio C-terminal intracelular como un disparador de la proteína EhRabB, o bien la proteína *EhRabB* pudiera estar participando en la endocitosis de este receptor para proceder a su desensibilización.

IX Conclusiones.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos obtener las siguientes conclusiones.

1. El tamizaje del banco de cDNA de *E histolytica* permitió el aislamiento de 4 clonas con diferentes longitudes de un mismo gen.
2. El gen completo codifica para una proteína de 491 aminoácidos con un peso molecular estimado de 56.9 kDa.
3. La proteína predicha presenta siete dominios transmembranales, característicos de receptores acoplados a proteínas G, involucradas en la transducción de señales.
4. El genoma de *E. histolytica* contiene al menos dos copias del gen aislado.

X BIBLIOGRAFIA

1. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica.
WWW.dgepi.salud.gob.mx/index.htm . 2003.
Ref Type: Electronic Citation
2. Acuna-Soto, R., J.H.Maguire, and D.F.Wirth. 2000. Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *Am J Gastroenterol.* 95:1277-1283.
3. Arroyo, R. and E.Orozco. 1987. Localization and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. *Mol Biochem. Parasitol* 23:151-158.
4. Bacón, R.A., A.Salminen, H.Ruohola, P.Novick, and S.Ferro-Novick. 1989. The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J Cell Biol* 109:1015-1022.
5. Bailey, G.B., P.S.Shen, M.J.Beanan, and N.E.McCoomer. 1992. Actin associated proteins of Entamoeba histolytica. *Arch Med Res* 23:129-132.
6. Bracha, R., Y.Nuchamowitz, M.Leippe, and D.Mirelman. 1999. Antisense inhibition of amoebapore expression in Entamoeba histolytica causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 34:463-472.
7. Brennwald, P. and P.Novick. 1993. Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* 362:560-563.
8. Bruchhaus, I., M.Leippe, C.Lioutas, and E.Tannich. 1993. Unusual gene organization in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *DNA Cell Biol* 12:925-933.
9. Chavrier, P., R.G.Parton, H.P.Hauri, K.Simons, and M.Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62:317-329.
10. Cinfuentes, E., U.Blumenthal, G.Rúiz-Palacios, S.Bennett, and A.and Peasley. 1994. Ambinete epidemiológico del uso de aguas negras en agricultura: Valle del Mezquital. *Salud Pública*3-9.
11. Clark, C.G. and A.J.Roger. 1995. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in Entamoeba histolytica. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* 92:6518-6521.

12. Conde-Bonfil, M.C. and C.Mora-Zerpa. 1992. [Entamoeba histolytica: a standing threat]. *Salud Publica Mex.* 34:335-341.
13. Cook, G.C. 1990. Parasitic disease in clinical practice. London G.B., London. 103-112 pp.
14. Diamond, L.S., D.R.Harlow, and C.C.Cunnick. 1978. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg.* 72:431-432.
15. Espinosa-Cantellano, M. and A.Martinez-Palomo. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 13:318-331.
16. Fischer, v.M., B.Stahl, C.Walch-Solimena, K.Takei, L.Daniels, A.Khoklatchev, P.De Camilli, T.C.Sudhof, and R.Jahn. 1994. Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur J Cell Biol* 65:319-326.
17. García-Rivera, G., M.A.Rodriguez, R.Ocadiz, M.C.Martinez-Lopez, R.Arroyo, A.Gonzalez-Robles, and E.Orozco. 1999. Entamoeba histolytica : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol* 33:556-568.
18. Geoffrey, M.C. 2000. The Cell: A molecular Approach. Sinauer Associates.
19. Gerst, J.E. 1999. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 55:707-734.
20. Ghosh, S.K., J.Field, M.Frisardi, B.Rosenthal, Z.Mai, R.Rogers, and J.Samuels. 1999. Chitinase secretion by encysting Entamoeba invadens and transfected Entamoeba histolytica trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun.* 67:3073-3081.
21. González, L., Jr. and R.H.Scheller. 1999. Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96:755-758.
22. Guillén, N. 1996. Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of Entamoeba histolytica. *Trends Microbiol* 4:191-197.
23. Guillén, N., M.F.Carlier, G.Brugerolle, I.Tardieux, and J.Ausseil. 1998. [Cytoskeletal actin and its associated proteins. Some examples in Protista]. *Parasite* 5:107-117.

24. Hay, J.C. and R.H.Scheller. 1997. SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 9:505-512.
25. Johnston, M. 1987. Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein. *Nature* 328:353-355.
26. Juárez, P., R.Sanchez-Lopez, R.P.Stock, A.Olvera, M.A.Ramos, and A.Alagon. 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.
27. Katz, U., S.Ankri, T.Stolarsky, Y.Nuchamowitz, and D.Mirelman. 2002. *Entamoeba histolytica* expressing a dominant negative N-truncated light subunit of its gal-lectin are less virulent. *Mol Biol Cell* 13:4256-4265.
28. Keegan, L., G.Gill, and M.Ptashne. 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231:699-704.
29. Keene, W.E., M.E.Hidalgo, E.Orozco, and J.H.McKerrow. 1990. *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* 71:199-206.
30. Kretschmer, R. 1994. Amibiasis: Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Trillas, México.
31. Leippe, M., J.Andra, R.Nickel, E.Tannich, and H.J.Muller-Eberhard. 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* 14:895-904.
32. Lewin B. 2001. Genes VII. Marbán L.S., España.
33. Ma, J. and M.Ptashne. 1987. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48:847-853.
34. Mann, B.J. 2002. *Entamoeba histolytica* Genome Project: an update. *Trends Parasitol* 18:147-148.
35. Mann, B.J. and L.A.Lockhart. 1998. Molecular analysis of the Gal/GalNAc adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J Eukaryot Microbiol* 45:13S-16S.
36. Mazzuco, A., M.Benchimol, and W.De Souza. 1997. Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron*. 28:241-247.

37. McGugan, G.C., Jr. and L.A.Temesvari. 2003. Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem. Parasitol* 129:137-146.
38. Mcknight, S.L. and K.R.Yamamoto. 1992. Transcriptional Regulation, book 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
39. Muñoz, M.L., M.A.Moreno, J.N.Perez-Garcia, G.R.Tovar, and V.I.Hernandez. 1991. Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. *Mol Microbiol* 5:1707-1714.
40. Ocádiz, R., E.Orozco, E.Carrillo, L.I.Quintas, J.Ortega-Lopez, R.M.Garcia-Perez, T.Sanchez, B.A.Castillo-Juarez, G.Garcia-Rivera, and M.A.Rodriguez. 2005. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol* 7:221-232.
41. Olkkonen, V.M. and H.Stenmark. 1997. Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* 176:1-85.
42. Orozco, E., G.Guarneros, A.Martinez-Palomo, and T.Sanchez. 1983. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* 158:1511-1521.
43. Orozco, E., M.A.Rodriguez, and, and F.De laCruz-Hernandez. 1988. The role of Phagocytosis in the pathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. In *Amibiasis*. John Wiley and sons, U.S.A.
44. Ostermeier, C. and A.T.Brunger. 1999. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* 96:363-374.
45. Pan, T. and J.E.Coleman. 1990. GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* 87:2077-2081.
46. Paveto, C., H.N.Torres, M.M.Flavia, M.Garcia-Espitia, A.Ortega, and E.Orozco. 1999. *Entamoeba histolytica*: signaling through G proteins. *Exp Parasitol* 91:170-175.
47. Pereira-Leal, J.B. and M.C.Seabra. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests

a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* 301:1077-1087.

48. Pérez-Tamayo, R. 1989. Patología de la amibiasis. 42-45 pp.
49. Petri, W.A., Jr., M.D.Chapman, T.Snodgrass, B.J.Mann, J.Broman, and J.I.Ravdin. 1989. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 264:3007-3012.
50. Petri, W.A., Jr., R.D.Smith, P.H.Schlesinger, C.F.Murphy, and J.I.Ravdin. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 80:1238-1244.
51. Picazarri, K. Aislamiento de genes de *Entamoeba histolytica* que codifican proteínas que interaccionan con *EhRabB*. 2001. Centro de Investigación y Estudios Avanzados -IPN. (CINVESTAV-IPN)- México D.F.
Ref Type: Thesis/Dissertation
52. Que, X. and S.L.Reed. 2000. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 13:196-206.
53. Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5:85-87.
54. Ramakrishnan, G., B.D.Ragland, J.E.Purdy, and B.J.Mann. 1996. Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* 19:91-100.
55. Ravdin, JI. 2000. Amebiasis. Imperial College Press., Londres.
56. Reyes-López, I. Expresión del gen *EhRabB* de *Entamoeba histolytica*. 2000. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Edo. de México.
Ref Type: Thesis/Dissertation
57. Rodríguez, M.A. Proteínas y genes que participan en la interacción de *Entamoeba histolytica* con la célula blanco. 1990. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México, D.F.
Ref Type: Thesis/Dissertation
58. Rodríguez, M.A., R.M.García-Pérez, G.García-Rivera, I.López-Reyes, L.Mendoza, V.Ortiz-Navarrete, and E.Orozco. 2000. An *Entamoeba*

histolytica rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem. Parasitol* 108:199-206.

59. Rodríguez, M.A. and E.Orozco. 1986. Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* 154:27-32.
60. Rosales-Encina, J.L., I.Meza, A.Lopez-De-Leon, P.Talamas-Rohana, and M.Rojkind. 1987. Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis.* 156:790-797.
61. Saito-Nakano, Y., M.Nakazawa, Y.Shigeta, T.Takeuchi, and T.Nozaki. 2001. Identification and characterization of genes encoding novel Rab proteins from *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem. Parasitol* 116:219-222.
62. Saito-Nakano, Y., T.Yasuda, K.Nakada-Tsukui, M.Leippe, and T.Nozaki. 2004. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 279:49497-49507.
63. Saito-Nakano, Y., T.Yasuda, Y.Shigeta, M.Nakazawa, T.Takeuchi, and T.Nozaki. 2000. Identification and characterization of a Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31:S155-S156.
64. Sambrook, J., E.F.Fritsch, and T.Manias. 1989. *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America.
65. Sánchez, M.A., D.A.Peattie, D.Wirth, and E.Orozco. 1994. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* alpha-tubulin-encoding gene. *Gene* 146:239-244.
66. Sander, C. and A.and Valencia. 1995. The Ras Superfamily. In *Guide book to the Small GTPase*. Oxford Univ., London.
67. Sanger, F., S.Nicklen, and A.R.Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A* 74:5463-5467.
68. Santiago, A., M.E.Carbajal, G.Benitez-King, and I.Meza. 1994. *Entamoeba histolytica*: PKC transduction pathway activation in the trophozoite-fibronectin interaction. *Exp Parasitol* 79:436-444.
69. Savage, D.C. and R.V.Blumershire. 1974. Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine

gastrointestinal ecosystem: scanning electron microscopy. *Infect Immun.* 10:240-250.

70. Talamas-Rohana, P., M.A.Schlie-Guzman, V.I.Hernandez-Ramirez, and J.L.Rosales-Encina. 1995. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. *Infect Immun.* 63:3953-3958.
71. Tanyuksel, M. and W.A.Petri, Jr. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 16:713-729.
72. Temesvari, L.A., E.N.Harris, S.L.Stanley, Jr., and J.A.Cardelli. 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* 103:225-241.
73. Valencia, A., P.Chardin, A.Wittinghofer, and C.Sander. 1991. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 30:4637-4648.
74. Vázquez, J., E.Franco, G.Reyes, and I.Meza. 1995. Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 32:37-45.
75. Welter, B.H., R.C.Laughlin, and L.A.Temesvari. 2002. Characterization of a Rab7-like GTPase, EhRab7: a marker for the early stages of endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem. Parasitol* 121:254-264.
76. Welter, B.H. and L.A.Temesvari. 2004. A unique Rab GTPase, EhRabA, of *Entamoeba histolytica*, localizes to the leading edge of motile cells. *Mol Biochem. Parasitol* 135:185-195.
77. Young, J.D., T.M.Young, L.P.Lu, J.C.Unkeless, and Z.A.Cohn. 1982. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 156:1677-1690.
78. Zhang, T. and S.L.Stanley, Jr. 1999. DNA vaccination with the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine* 18:868-874.

XI APÉNDICE

MEDIO TYI-S33

- 30 G Biosate
- 9 g glucosa
- 2 g NaCl
- 0.6 g KH_2PO_4 .
- 1.63 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 1.25 g L-Cisteína
- 0.25 g Ácido ascórbico
- aforar a 870 ml
- ajustar pH 6.8
- 2% de suero bovino con 1.2 U/ml de penicilina y 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina

TAE 10X

- 24.2 g Tris base
- 5.71 ml ácido acético glacial
- 4 ml EDTA 0.5 M pH 8.0
- aforar a 500 ml

BUFFER DE CARGA (DNA)

- Disolver 0.25 g de azul brillante R-250 en .
- 90 ml de metanol: H_2O (1:1 v/v) y
- 10 ml de ácido acético glacial
- filtrar la solución a través de filtro Whatman n°1

PBS pH 7.4

- 5 ml Na₂HPO₄ 1M
- 5 ml NaH₂PO₄ 1M
- 30.8 ml NaCl 5M

TE pH 7.4

- 10 mM Tris HCl (pH8.0)
- 1 mM EDTA (pH8.0)
- 1 M NaCl

SOUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN

- 50% de Formamida desionizada
- 5X Denhardt
- 1% SDS
- 100µg/ml DNA esperma dse salmón
- 6X SSC

SOLUCIÓN DENHARDT 50X

- 0.5 g Ficoll
- 0.5 g Polivinilpirrolidona
- 0.5 g Suero bovino albúmina
- H₂O para 50 ml
- Filtrar y almacenar a -20°C

SSC 20 X

- NaCl 3 M
- Citrato de sodio 0.3 M

MEDIO 2TY

- Triptona 8 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 2.5 g
- Ajustar a 7.5 de pH
- Disolver en 500 ml de H₂O
- Esterilizar

PBS 0.05%-TWEEN 20 pH 7.4

- 8 g NaCl
- 0.2 g KH₂PO₄
- 2.9 g Na₂HPO₄12H₂O
- 0.2 g KCl
- 0.5 ml Tween 20

PBS 20 mM pH 7.4

- 8 g NaCl
- 0.2 g KH₂PO₄