



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

03072

10

28

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONALES Y DE POSTGRADO DEL COLEGIO DE  
CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CARACTERIZACION  
MOLECULAR DE UN  
FRAGMENTO DE UN GENE  
SIMILAR A HSP70 DE**

*Entamoeba histolytica*

FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO  
DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**P R E S E N T A**

**RENE HERNANDEZ VARGAS**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CUERNAVACA, MOR. DICIEMBRE DE 1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Este trabajo fue llevado a cabo en el Departamento de Reconocimiento  
Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología/UNAM.  
Bajo la dirección y asesoramiento del  
Dr. Alejandro Alagón Cano y del Dr. Paul M. Lizardi López.

Cuernavaca Mor. 1995

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que me apoyaron en la realización de esta tesis.

En primer lugar al Dr. Alejandro Alagón C. y al Dr. Paul M Lizardi L. por haber dirigido este trabajo de tesis.

Así mismo al Dr. Jorge Nieto, al Dr. Mario E. Zurita, al Dr. Enrique Merino, y el Dr. Ruy Pérez-Montfort quienes amablemente accedieron a revisar esta tesis y la enriquecieron con sus comentarios.

Un agradecimiento muy especialmente a La Dra. María de Lourdez Muñoz y al Dr Alejandro Bayón (†), por sus consejos durante esta etapa de formación académica.

Les agradezco, a la M en B. Georgina Estrada, al Biol. Alejandro Olvera, al Q.I. Eugenio Bustos, Felipe Olvera y Angelica Linares que me apoyaron con su excelente trabajo técnico y administrativo.

A quienes quiero y me acompañaron en esta aventura. A Elsa María por su cariño, su compañía y paciencia. A todos mis compañeros de laboratorio, -Helena, Isabel, Laurence, Rosana, Bertha, Socorro, Carlos, Felipe, Alejandro, Estefan, Luis Miguel, Marco, Miguel Angel y Macario- que siempre hicieron mi estancia mas agradable.

Quiero agradecer también a las autoridades del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las facilidades y apoyo que recibí para la realización de este trabajo.

# CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Supervivencia en condiciones de estrés.....	4
HSP70.....	8
La familia de HSP70.....	8
Funciones de HSP70.....	8
Estructura de HSP70.....	10
Función de las HSP70 en tolerancia al estrés <i>in vitro</i> .....	10
Función de HSP70 en tolerancia al estrés <i>in vivo</i> .....	11
Las proteínas de estrés en parásitos.....	11
Las HSPs en la relación huésped-parásito.....	12
AMIBIASIS.....	14
Ciclo de vida.....	14
Los trofozoitos.....	14
Las HSPs y la secreción de proteínas en <i>E. histolytica</i> .....	15
OBJETIVO GENERAL.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	17
Materiales.....	18
PCR y aislamiento de la clona EHHSP70_4.5kb.....	19
Obtención de la subclona EHHSP70_1.3kb.....	19
Análisis computacional de la secuencia obtenida.....	21
Aislamiento de DNA de <i>E. histolytica</i> .....	21
Determinación de concentración de DNA genómico.....	22
Obtención de RNA de <i>E. histolytica</i> .....	22
Ensayo tipo Southern.....	23
Primer extensión.....	23
RT-PCR.....	24
Ensayo tipo "Northern blot".....	25
RESULTADOS.....	26
Secuenciación y análisis del inserto de la clona EHHSP70_1.3kb.....	26
Sitios de reconocimiento para factores transcripcionales.....	30
El sitio de inicio de la transcripción y otros motivos de la región 5'-no codificante.....	32
Análisis del dominio de unión al ATP.....	35
Ensayo de "Southern blot".....	35
Ensayo de Transcripción reversa-PCR.....	40
Ensayo de "Northern blot".....	40
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

## ABREVIATURAS :

ADP	Difosfato de adenosina
AMV-RT	Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis avícola
ATP	Trifosfato de adenosina
Br Et	Bromuro de etidio
$\mu$ Ci	Microcuries
cpm	Cuentas por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DnaJ	HSP60 ( <i>E.coli</i> ).
DnaK	HSP70 ( <i>E.coli</i> ).
EDTA	Acido Etilendiaminotetracético
$\mu$ g	Microgramos
gr	Gramos
GrpE	HSP20 ( <i>E.coli</i> ).
HK9	Cepa de <i>E. histolytica</i>
HSc70	Proteína constitutiva similar a HSP de 70kd.
HSE	Elemento de choque térmico similar a HSP
HSF	Factor de choque térmico
HSP	Proteína de choque térmico
$\mu$ l	Microlitros
M	Molar
$\mu$ m	Micrómetros
$\mu$ M	Micromolar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar

N	Concentración normal
nt	Nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
pmol	Picomolas
%	Porcentaje
RNA	Acido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
RNAsa	Ribonucleasa
RNAsin	Inhibidor de ribonucleasas (Promega).
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
SFL-3	Cepa de <i>E. histolytica</i>
Ssa	HSP70 (levadura).
Ssb	HSP70 (levadura).
TE	Tris/EDTA
°C	Grados Celsius
3'-UTR	Región 3'-no codificante
<sup>32</sup> P	Fósforo 32

## RESUMEN

Entre las proteínas de choque térmico, la HSP70 parece ser la más conservada presentando una familia de proteínas relacionadas. Usando dos oligonucleótidos degenerados y DNA genómico de *Entamoeba histolytica* (HK9), amplificamos por PCR un fragmento de DNA de 630pb. Este fragmento se utilizó como sonda para seleccionar, en una librería genómica de *E. histolytica* (HK9), una clona de 4.5kb (EHHSP70\_4.5kb), de la cual se obtuvo la subclona (EHHSP70\_1.3kb). La subclona EHHSP70\_1.3kb codifica para la región N-terminal (240 aminoácidos) de una HSP70 putativa, ya que tiene una alta homología (85%) con la secuencia en amino ácidos de otra HSP70 (ENHHSP70A), reportada por Ortner et al. (1992) en *E. histolytica* (SFL-3). Esta secuencia corresponde parcialmente al dominio de unión de ATP de las HSP70, con una delección de 111 residuos en relación al extremo N-terminal de la proteína ENHHSP70A. Por análisis comparativo, la secuencia de la región 5' no codificante mostró motivos de reconocimiento de HSF y una secuencia TATA que se conforma por el consenso en amiba (Bruchhaus M, 1992). El análisis por "primer extension" determinó el sitio de inicio de la transcripción a 104pb del sitio ATG. El gene EHHSP70\_1.3kb se encontró unicopia en el genoma por ensayos de "Southern blot", mientras que por "Northern blot" se detectaron transcritos heterogéneos con tamaños que van de 0.8 a 1.3kb. Considerando que las HSP70 de los parásitos tienen excepciones a la regla generalizada en organismos eucariontes (Lopez, 1993; Martin, 1993), pensamos que la secuencia EHHSP70\_1.3kb es parte de un gene de la familia HSP70 de tamaño más corto con funciones específicas en procesos celulares de la *E. histolytica*.



# INTRODUCCION

Los organismos responden a incrementos repentinos en temperatura sintetizando un pequeño grupo de proteínas llamadas proteínas de estrés térmico (HSP)[Figura 1]. Esta respuesta al estrés ha sido conservada a través de la evolución, no solo como un fenómeno fisiológico, sino también a nivel de proteínas individuales. La familia de proteínas HSPs comprende una de la más conservadas. El nivel de identidad en aminoácidos entre todas las proteínas HSP70 de procariontes y eucariontes se aproxima al 50% (Gupta et al.1992). La familia de HSPs incluyen miembros que están siempre presentes (constitutivos), y los que son inducibles por calor. En muchos casos son las proteínas constitutivas las más abundantes.

### **SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

Históricamente, tres observaciones sugieren que las HSPs protegen a las células y organismos del estrés. Primero, su inducción tiene el carácter de una respuesta a emergencias, ya que es extremadamente rápida y muy fuerte. Por ejemplo, en *Drosophila* hay cinco copias del gene HSP70 por genoma haploide y su regulación a niveles de transcripción, traducción, procesamiento y estabilidad de RNA trabajan en conjunto para producir más de 1000 veces de aumento de la proteína bajo estrés por calor (Klemenz et al. 1985; Lindquist, 1980; McGarry et al. 1995; Petersen et al. 1988; Yost et al. 1986) La complejidad de los mecanismos regulatorios dados para HSP70 sugiere que es de vital importancia para la célula acumular rápidamente esta proteína durante momentos de estrés. La inducción de HSPs en otros organismos, si no son del todo tan extremas como en *Drosophila*, sí cumple las características de rapidez y especificidad.

Segundo, las HSPs se inducen a diferentes temperaturas en distintos organismos, pero en cada caso, la inducción por temperatura refleja condiciones de estrés para el organismo. Por ejemplo, bacterias termofílicas inducen proteínas "heat-shock" cuando cambian de 94°C a 105°C (Trent et

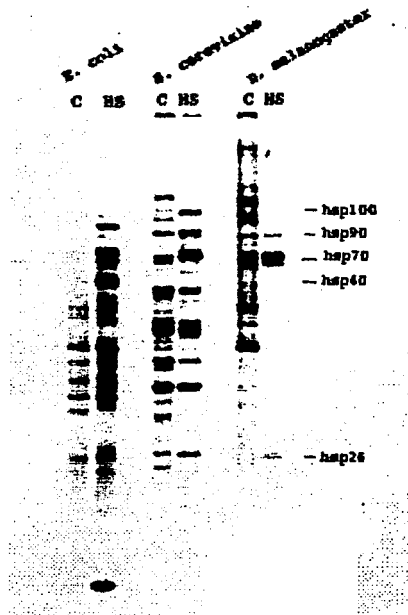


FIGURA 1. INDUCCION DE PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO. Células en crecimiento logarítmico se marcaron con pulsos de <sup>3</sup>H-leucina a temperaturas de crecimiento normal (C) o después de un aumento de temperatura (*E.coli*, 50°C, 10 min; *S. cerevisiae*, 39°C, 20 min y *D. melanogaster*, 36.5°C, 45 min) [HS]. La proteínas totales se separaron en 10% SDS-PAGE y reveladas por autoradiografía. Las HSPs mas abundantes forman la familia HSP70, las cuales tienen un peso molecular de alrededor de 70,000 daltons (figura tomada de Parsel, et al. 1993).

al. 1990).

Finalmente y la más compleja, la inducción de HSPs correlacionada con la inducción de tolerancia al calor extremo en una amplia variedad de células y organismos (Sanchez et al. 1990). La inducción de HSPs también se correlaciona con tolerancia inducida por otros tratamientos de estrés como altas concentraciones de etanol o metales pesados (Lindquist, 1992; Subject et al. 1986). La correlación es tan fuerte tanto en inducciones mediadas durante el desarrollo como en situaciones mediadas por estrés. En levaduras, por ejemplo, las esporas y células en fase estacionaria constitutivamente expresan HSPs y tienen elevados niveles basales de termotolerancia (Plesset et al. 1987). De manera similar, las semillas de trigo en germinación constitutivamente expresan HSPs y tienen una elevada termotolerancia intrínseca (Abernethy, et al. 1989). Contrariamente, algunos organismos son incapaces de expresar HSPs en ciertos estadios primarios de su desarrollo embrionario como *Drosophila* (Dura, 1981), caracol (Boon-Niermeijer, 1991), erizo de mar (Sconzo, et al.1986), *Xenopus* (Heikkila, et al. 1985) y mamíferos (Muller, et al. 1985), que se caracterizan por una termosensibilidad poco común.

El papel de cada HSP en la protección esta empezando a ser disectada. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, algunas HSPs (HSP70) son requeridas para crecer a temperaturas cercanas al punto superior del rango normal de crecimiento (Craig, et al. 1895), otras para sobrevivir por tiempos largos a temperaturas moderadamente altas (ubiquitina) (Finely, et al. 1987), y otras para una tolerancia a temperaturas extremas como HSP104 (Sanchez, et al. 1992). Además, diferentes organismos usan diferentes HSPs para responder a niveles de estrés similares. Por ejemplo, la tolerancia a un estrés extremo depende en gran medida de HSP104 en levadura, de HSP70 en *Drosophila* y de HSP70, HSP27 y tal vez HSP110 en mamíferos (Landry, et al. 1989; Sanchez, et al. 1992; Solomon et al. 1991). La comprensión de esta diversidad en

estrategias de tolerancia podrá depender de la elucidación de cómo cada HSP funciona en la protección de las células al estrés.

La señal común para la inducción de HSPs aparece con la presencia de proteínas anormales. Los tratamientos que inducen eficientemente la síntesis de HSPs *"in vivo"* también dañan o desnaturalizan proteínas *"in vitro"*. Esto es, la exposición a altas concentraciones de etanol, arsenito de sodio o iones de metales pesados, todos disparan una respuesta tipo "heat-sock" (Zimarino, 1987 ). La adición de análogos de aminoácidos y puromicina que producen proteínas anormales, son eficientes inductores de HSP (Goldber, 1972; Pine,1967). Tanto la acumulación intracelular de proteínas extrañas, proteínas desnaturalizadas o proteínas con estructura desestabilizada que contienen sustituciones de aminoácidos, inducen la síntesis de HSPs en una variedad de células (Ananthan, et al.1986.;Parsell, et al. 1989; Pine, 1967).

Existen al menos dos vías generales en las cuales las HSPs pueden ayudar eficientemente a las células que tienen polipéptidos dañados por estrés. Primero, las HSPs pueden promover la degradación de proteínas anormales, de hecho, algunas HSPs tienen algunas actividades proteolíticas intrínsecas y otras guardan funciones auxiliares en protéolisis. Segundo, las HSPs pueden reactivar proteínas dañadas por el estrés. Varias HSPs son conocidas como "chaperonas moleculares" que impiden la agregación y promueven la correcta "renaturalización" de proteínas desnaturalizadas. No se entienden hasta el momento los factores que acompañan a las proteínas dañadas por estrés a lo largo de las vías de degradación y/o renaturalización (Parsell, et al. 1993 ).

## HSP70

### LA FAMILIA DE HSP70.

Los eucariontes producen una multitud de proteínas de la familia de HSP70. Tan solo en *S. cerevisiae* se han identificado nueve miembros diferentes que comparten 50-97% de identidad a nivel de aminoácidos y se agrupan genéticamente en al menos cuatro grupos distintos SSA1-4, SSB1-2 SSC1 y KAR2. (Lindquist, et al. 1988. ).

Los distintos miembros se localizan en el retículo endoplásmico (Munro, et al. 1986 ), mitocondria, y cloroplastos. Otros se encuentran en el núcleo y citoplasma, algunos están expresados constitutivamente (HSc70), otros son inducidos por calor o frío, otros viajan entre el nucleólo, el núcleo y el citosol. Los organismos multicelulares contienen varias versiones específicas de tejido como las HSP70 específicas de testículo (Allen, et al. 1988 ).

Por años se pensó que el genoma de *E. coli* codificaba solo para una proteína HSP70, la "DnaK", que se expresa constitutivamente y/o es inducida por calor. Recientemente, dos proteínas relacionadas han sido identificadas, una Hsc66, que comparte 40% de identidad con DnaK, se encuentra en un operon bicistrónico con ferredoxina, lo que sugiere que puede jugar un papel específico en el plegado o ensamble correcto de esta proteína (Seaton, et al. 1994 ). La otra proteína, MreB, comparte 27% de identidad con la región amino terminal de HSP70 y está involucrada en división celular (Gupta et al. 1992. ). También se empiezan a identificar en eucariontes, proteínas relacionadas más distantemente a HSP70 (Folz, et al. 1993 ; DeNagel, et al. 1993).

### FUNCIONES DE HSP70

Las proteínas de HSP70 se unen a péptidos pequeños (con una preferencia por aminoácidos hidrofóbicos) [Flynn, et al. 1991 ], a cadenas

nacientes sobre polisomas (Beckmann, et al. 1990. ), a proteínas que han sido dirigidas a compartimentos celulares equívocos (Bird, et al. 1987 ), a ciertas subunidades protéicas que son expresadas en ausencia de sus demás partes (Munro, et al.1986) y a ciertas proteínas oligoméricas en procesos de ensamblaje y desensamblaje (Rothman, et al. 1986. ). Al unirse a estos sustratos, las HSP70's participan en una variedad de procesos de plegado, desnaturalización, ensamble, desensamblaje y procesos de translocación.

La hipótesis que explica el papel de HSP70 en estos procesos, es la unión de HSP70 a regiones hidrofóbicas impidiendo asociaciones desventajosas y estabilizando la proteína blanco en su estado desnaturalizado en forma total o parcial (Pelham, 1986. ). Un proceso dependiente de ATP, promueve la liberación del sustrato permitiendo continuar el plegado, transporte o ensamblaje. (Gething, et al. 1992. ).

Mientras que las HSP70 son similares en su funcionamiento general de chaperonas de proteínas desnaturalizadas, algunas funciones específicas están involucradas para miembros individuales de la familia que se dispersan a compartimentos celulares separados y funcionan únicamente de manera local. Una mayor especialización existe dentro de compartimentos en particular. Por ejemplo, en levadura, dos proteínas de la familia HSP70 son expresadas en el compartimiento nuclear/citoplásmico, la Ssa y la Ssb. Algunas mutaciones en la Ssa causan fuertes defectos en el transporte de precursores a través de la mitocondria y membranas del RE, mientras las mutaciones en Ssb resultan solo en defectos en la síntesis de proteínas, de acuerdo con el papel de esas proteínas de ayudar a cadenas nacientes de los polirribosomas (Nelson, et al. 1992) . Aún cuando las proteínas Ssa y Ssb pueden tener funciones comunes, éstas tienen, claramente, un considerable grado de especialización.

## ESTRUCTURA DE HSP70

Todas las proteínas de HSP70 estudiadas hasta la fecha muestran dos dominios. El dominio amino terminal es el más conservado y contiene un sitio de alta afinidad de unión de ATP. El carboxilo terminales menos conservado y es responsable de la unión a las proteínas sustrato y polipéptidos. Esta organización sugiere que las HSP70 tienen un mecanismo común para utilizar la energía del ATP. Los dos dominios son interdependientes: la actividad de ATPasa se estimula fuertemente por la unión al sustrato y la liberación del sustrato depende de la naturaleza del nucleótido unido. En general, las HSP70s requieren de la hidrólisis de ATP para la liberación del sustrato; cuando se utiliza un análogo de ATP que resiste la hidrólisis (ATP- $\gamma$ -S), no se promueve la liberación del sustrato. Sin embargo, un análisis detallado mostró que la adición de ATP al complejo HSP70-sustrato-ADP, activa una liberación total del sustrato antes de que ocurra una hidrólisis estequiométrica del ATP. Por tanto, parece que la transición de la unión de ADP a la unión de ATP en la HSP70 dirige la liberación del sustrato (Palleros, et al. 1993).

## FUNCION DE LAS HSP70 EN TOLERANCIA AL ESTRES *IN VITRO*.

Sólo existen dos ejemplos que han estudiado en detalle las funciones de HSP70 específicos de estrés *in vitro*. El primer estudio examinó el efecto de DnaK sobre la desnaturalización y agregación de RNA polimerasa (RNAP) a 42°C (Skowrya, et al. 1990.). La DnaK (en un exceso molar de 60 veces) es capaz de proteger la RNAP de la inactivación por alta temperatura y de reactivar la RNAP previamente desnaturalizada por calor, aunque el mecanismo en cada uno de los procesos parecen ser distintos. En el caso de protección no se requieren de ATP y una proteína mutante de DnaK<sup>756</sup> es funcional. Para la reactivación, se requiere ATP y DnaK<sup>756</sup> no fue funcional.

Los efectos de HSP70 *in vivo* e *in vitro* sobre la desnaturalización y



renaturalización de la luciferasa de luciérnaga muestran la función de HSP en la tolerancia al estrés. (Schroeder et al.1993. ). La luciferasa expresada en *E. coli* se inactiva rápidamente cuando las células son colocadas a 42°C, pero se reactiva cuando las células son devueltas a 30°C. La inactivación ocurre tanto en presencia o ausencia de DnaK, DnaJ o GrpE, pero las tres proteínas son indispensables para la reactivación. La reactivación *in vitro* de luciferasa termoinactivada requiere de la presencia de DnaJ durante el paso inicial de termodesnaturalización. La proteína suprime la agregación de luciferasa por la formación de un complejo. Estando la DnaJ unido al substrato desnaturalizado, DnaK y GrpE promueven la renaturalización y liberación de luciferasa por un mecanismo dependiente de ATP. En contraste a los estudios con RNA polimerasa, la DnaK por sí sola fue incapaz de reactivar la luciferasa, aun cuando se utilizó en una concentración molar 100 veces mayor.

#### **FUNCION DE HSP70 EN TOLERANCIA AL ESTRES *IN VIVO*.**

En muchos organismos, las proteínas HSP70 están entre las más prominentes de todas las HSPs. Los primeros experimentos mostraron una estrecha correlación entre la inducción de estas proteínas y la inducción de tolerancia a altas temperaturas. (Li, et al.1991). Cuando se aclaró el papel de HSP70 en ayudar a proteínas desnaturalizadas a temperatura normal se asumió su papel de chaperona de proteínas dañadas por estrés, se observó como una extensión natural y lógica. ( Plessset , et al. 1987 ; Pelham, 1986 ). En la actualidad, es claro que la formas termoinducibles de HSP70 juegan un papel central en la tolerancia al estrés para promover el crecimiento a temperaturas moderadamente elevadas y/o proteger a los organismos de la muerte a temperaturas extremas. La importancia de HSP70 en la tolerancia al estrés, varía sorprendentemente en varios organismos.

## **LAS PROTEINAS DE ESTRES EN PARASITOS.**

Las HSPs de los parásitos cumplen un papel importante en los procesos de adaptación al huésped tanto en diferenciación como en infectividad. En los últimos años se han descrito muchos genes de choque térmico en parásitos (Marresca, et al. 1992). Sin embargo, todavía es muy limitado el conocimiento que se tiene de los mecanismos de regulación de éstos genes en parásitos. En eucariotes, la activación transcripcional de los genes HSP producida por temperatura está mediada por un elemento en *cis*, conocido como elemento de choque térmico (HSE) localizado 80-150 nucleótidos por encima del sitio de inicio de la transcripción (Lindquist 1986). Este elemento presenta una elevada conservación de secuencia (NGAANN TTCN) [Pelham, 1985; Xiao H. et al. 1988], que específicamente se une a una proteína llamada factor de transcripción de choque térmico (HSF). Por análisis comparativo de los genes de choque térmico en parásitos se han encontrado secuencias que presentan similitud con los HSE (Newport, et al. 1988; Polla, 1991), pero aún queda por demostrar su implicación en la regulación génica de estos genes. Se postula, sin embargo, que los mecanismos de activación de los genes de choque térmico en parásitos no son los mismos que los de otros organismos eucariotes.

Otro elemento relevante es la demostración de una complejidad elevada de isoformas de la familia HSP70 en *T. cruzi*, lo que puede estar reflejando la importancia que esta proteína debe tener en el ciclo de vida de éste parásito. (Martin, et al. 1993). Mientras que en *E. histolytica* Ortner, y col, (1992) aislaron varios cDNAs de diferentes longitudes, tan cortos que codifican para 241 aminoácidos con alta homología a secuencias Carboxi-terminal de HSP70.

## **LAS HSPs EN LA RELACION HUESPED-PARASITO.**

Un desarrollo excitante concierne al papel de la respuesta al estrés

en inmunología y daño infeccioso ya que, en los procesos infecciosos que afectan a millones de gentes cada año como consecuencia de infecciones por bacterias y microorganismos parasíticos, los inmunólogos han encontrado que las proteínas de estrés hechas por estos organismos son los principales antígenos, o proteínas blanco, que el sistema inmune usa para reconocer y destruir a los invasores. (Koufmann, 1990, Hedstrom, et al. 1988). Las HSPs de varios patógenos, cuando son producidas en el laboratorio por técnicas de DNA recombinante, tienen el potencial como vacunas para la prevención de infecciones microbianas y parasitarias. Además, debido a su inmunogenicidad, las proteínas de estrés son consideradas como adyuvantes (Barrios, et al. 1992). Así, unidas a proteínas del parásito, pueden aumentar la respuesta inmune contra infecciones.

La similitud estructural entre las proteínas de choque térmico microbianas y del huésped hace que el sistema inmune esté obligado constantemente a discernir las diferencias mínimas (Kaufmann, 1990). La posibilidad de colocar a las proteínas de estrés en la interface entre tolerancia a un organismo y autoinmunidad es una intrigante idea que continua provocando el debate entre los investigadores. (Welch, 1993 ).

Mientras el trabajo descrito en esta tesis se realizaba, Ortnier, y col. (1993) buscando en una librería de expresión de cDNA *E. histolytica* cepa SFL-3 con anticuerpos de pacientes encontraron una respuesta positiva en 3 de 12 pacientes para la proteína HSP70. Es conocida la respuesta del huésped hacia estas proteínas de choque térmico de organismos infecciosos, sin embargo Ortnier y col. concluyen que la respuesta en la ameba hacia esta proteína es en particular poco generalizada dentro de los pacientes con absesos hepáticos amebianos.

## AMIBIASIS

De las seis especies de amibas que pueden habitar en el intestino del hombre la *E. histolytica* es la única de importancia médica por ser un parásito patógeno. Esta amiba se encuentra en fase de comensal aproximadamente en la décima parte de la población mundial. Una de cada cien infecciones intestinales, generalmente disentería amibiana, es a consecuencia de la invasión de la mucosa del intestino grueso por las amibas. En el diez por ciento de este último grupo, la invasión amibiana progresa del intestino al hígado en donde el parásito puede producir abscesos hepáticos, generalmente progresivos y de evolución mortal, a menos que los pacientes reciban tratamiento adecuado. (Martínez-Palomo, 1982 )

### CICLO DE VIDA.

El ciclo, incluye cuatro estadíos consecutivos: trofozoitos, prequistes, quistes y formas metaquísticas. La investigación se ha centrado en las formas quísticas y en los trofozoitos dejando atrás el conocimiento de los otros dos estadíos. Los trofozoitos proliferan en el colon donde, bajo condiciones no conocidas, originan las formas de resistencia: los quistes. Los quistes, presentes en las heces de los portadores asintomáticos, son redondeados, hialinos, de 8 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro con una pared rígida. Estos quistes contaminan los alimentos y el agua, al llegar a un nuevo huésped se disuelve la pared por acción de los jugos gástricos e intestinales. Después de varias divisiones celulares, cada quiste da origen a ocho amibas en la luz del intestino grueso del inadvertido huésped humano.

### LOS TROFOZOITOS.

Los trofozoitos de *E. histolytica* son células pleomórficas con diámetro que varía entre 10 y 60  $\mu\text{m}$ . Vistos al microscopio óptico muestran movimientos citoplásmicos y de desplazamientos continuos. Generalmente

tienen un pseudópodo frontal y una cola, o uroide, además de numerosos y finísimos filópodos. La intensa actividad endocítica del parásito puede manifestarse como numerosos estomas de pinocitosis o de fagocitosis (Martínez-Palomo, 1982 ).

La organización submicroscópica del trofozoíto se caracteriza por la ausencia de organelos diferenciados presentes en células eucarióticas típicas como: mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso o rugoso bien definidos y microtúbulos citoplásmicos.

El citoplasma de la *E. histolytica* posee, en cambio, una gran cantidad de vesículas, muchas de ellas con material particulado en degradación, abundantes ribosomas que forman cúmulos pseudocristalinos en los prequistes (los cuerpos cromidiales) y una variedad de componentes tubulares y filamentosos mal definidos.

El citoesqueleto de *E. histolytica* es sorprendentemente sencillo y poco estructurado. Los microfilamentos de actina se encuentran concentrados en zonas de adhesión cercanas a la membrana plasmática y en regiones de fagocitosis, pero distan mucho de mostrar el grado de organización que muestran los microfilamentos en otros protozoarios o en células de metazoarios (Martínez-Palomo, 1987 ).

### **LAS HSPs Y LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. histolytica***

El papel de una HSP70 en el plegamiento, translocación a diferentes organelos y degradación de proteínas, así como su regulación bajo diferentes condiciones de estrés, son elementos importantes para la síntesis, tráfico y secreción de proteínas en la mayoría de las células.

Las HSPs en la vida de un parásito como *E. histolytica* pueden tener diversas funciones particulares debido a la organización subcelular que este organismo presenta.

Es de mucho interés en nuestro grupo de trabajo definir no solo los

eventos, sino también de manera primordial, los elementos moleculares involucrados en la síntesis, tráfico y secreción de proteínas en *E. histolytica*. Consideramos que la identificación y caracterización de las HSPs de *E. histolytica* nos proporcionaría información sobre uno de los marcadores moleculares implicados en la síntesis y etapa inicial del tráfico de proteínas en amiba.

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente un fragmento de un gene similar a Hsp70 de *E. histolytica*

### Objetivos particulares:

- Secuenciar una clona de 1.3kb que contiene un fragmento de un gene de HSP70 de *E. histolytica*.
- Analizar con herramientas computacionales la secuencia del gene y su región 5' no codificante.
- Realizar un análisis genómico por experimentos de "southern blot".
- Determinar su expresión por RT-PCR y Northern blot.
- Identificar el sitio de inicio de la transcripción.

*MATERIAL Y  
METODOS*



## MATERIALES

En este proyecto trabajamos con la cepa *E. histolytica* HK9, caracterizada por presentar un zimodemo patógeno (Said-Fernández, et al. 1988) y cultivada en condiciones axénicas en el medio de cultivo TYI-S-33. (Diamond, et al. 1968).

Las enzimas de restricción, la Taq DNA polimerasa, polinucleótido cinasa y los dideoxinucleótidos, los obtuvimos de Boehringer Mannheim. Los nucleótidos radioactivos de New England Nuclear. La transcriptasa reversa (AMV-RT) de Promega. La membrana de nylon N+ de Amersham. El resto de los reactivos utilizados fueron grado biología molecular de Sigma Chemical. Las manipulaciones estándar de biología molecular se hicieron de acuerdo a los protocolos que se reportan por Ausubel, et al 1992. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 1.

**TABLA 1. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio**

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'	SINTESIS	OBSERVACION <sup>a</sup>
HSP2.MAC	GAA ATW ATW GCW AAY GAT CAA GG	IBT	2
HSP1.MAC	ATC TTC WCC WCC AAG WTG AGT ATC	IBT	2
FORWARD/23	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG	OPERON	1,6
REVERSE/24	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	OPERON	1
RHHSPDIF25	GAG AGA TTT CAG TTG CAT ATT GTTG	OPERON	1,5
RHDIF.INV	CAA TAT GCA ACT GAA ATC TCT C	OPERON	1,3,6
RH2HSP	GAT ACA TCA AAT GTT CC	OPERON	1
RHATG20	CTG TAA ATC CTT TAA CTT GG	IBT	1,3,4
RH4HSP24	TTG AGA ATC ATT GAA ATA TGC TGG	OPERON	1,3
RH239UP	ATC AGT ACA ATC AGT ATC AC	OPERON	1
RH3HSP	GAT GGA CAT GAT AAA CC	OPERON	3,5
D14.MAC	CGA GCY GGY AGA AGA TT	IBT	1
D9.MAC	GCA TTG ATA GGA GGA AG	IBT	1
ACTINA 1	GAA TAT CAG AAA GCA TCT TTA TG	IBT	3
ACTINA 2	GAA GAA TTT TCT GTG CAC AAT AGG	IBT	3

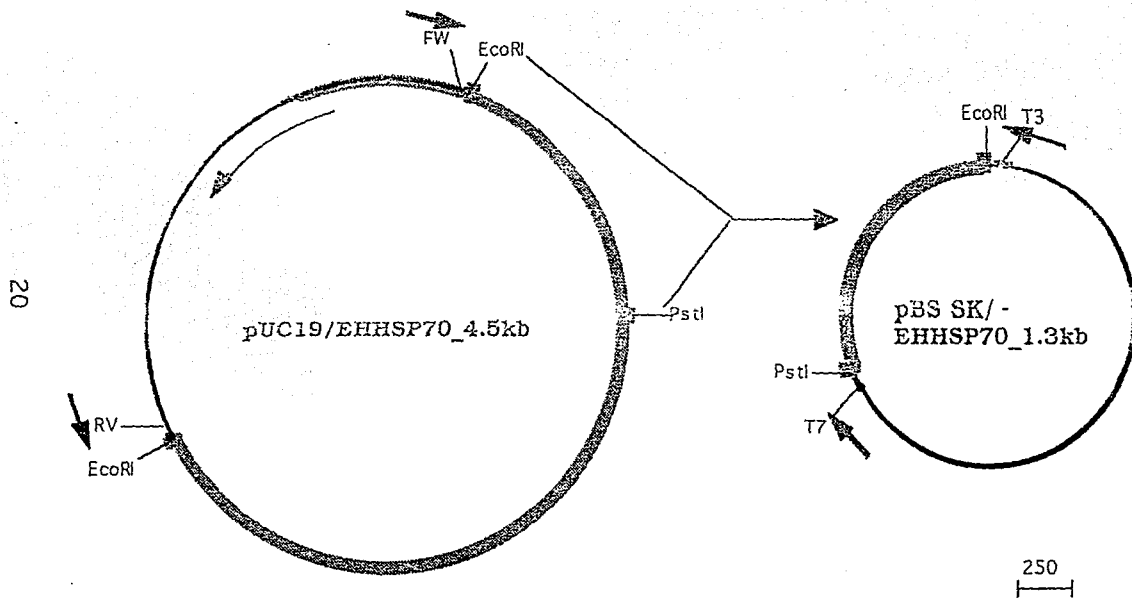
<sup>a</sup>Los oligonucleotidos fueron usados en: <sup>1</sup> Secuenciación; <sup>2</sup> PCR genómico; <sup>3</sup> RT-PCR; <sup>4</sup> Primer extension; <sup>5</sup> Southern Blot; <sup>6</sup> Producto de PCR de 750pb.

## PCR Y AISLAMIENTO DE LA CLONA EHHSP70\_4.5kb

El diseño de los oligos degenerados (HSP2.MAC y HSP1.MAC) se realizó en base al alineamiento múltiple con los genes de hsp70 de *Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus*, *Schistosoma mansoni*, *Caenorhabditis elegans*, *Petunia hybrida* y *Trypanosoma cruzi*. Los oligos HSP2.MAC y HSP1.MAC se posicionaron a 25-32aa y 232-239aa respectivamente del amino terminal de acuerdo al consenso generado por el alineamiento múltiple. La generación del producto de amplificación de PCR (640pb) para HSP70 de *E. histolytica*, su utilización en la búsqueda de fagos recombinantes positivos en el banco genómico ( $\lambda$ gt10) del laboratorio fueron realizadas por el Dr. Miguel A. Cevallos. Como resultado de estos experimentos se obtuvo la clona EHHSP70\_4.5kb subclonada en el vector pUC19.

## OBTENCION DE LA SUBCLONA EHHSP70\_1.3kb.

La clona EHHSP70\_4.5kb se secuenció parcialmente utilizando los oligos del polilinker de pUC19 (Figura 2) con el kit de secuenciación para cadena doble y oligo marcado de BRL (dsDNA Cycle Sequencing System) bajo las indicaciones del fabricante. Esto determinó la orientación del inserto de 4.5kb. Como parte de la estrategia de secuenciación se decidió realizar una subclonación para secuenciar la región 5' del gene. La Dra R. Sanchez, subclonó en el plasmido BlueScript SK un fragmento de 1.3kb que contenía la secuencia de interés después de digerir con *EcoR1/Pst1*. De esta manera se continuó la secuenciación con los oligos "reverse/24" y "forward/23" del polilinker y los oligos internos RHSPDIF25; RHDIF.INV; RH4HSP24, RHATG20, RH239UP Y D14.MAC. El análisis de los resultados de las diferentes reacciones de secuencia se realizó con ayuda del programa GeneWorks de Inteligenetics. Inc.



**FIGURA 2 SUBCLONACION DE EHHSP70\_1.3kb.**

Clona pUC19/EHHSP70\_4.5kb que contiene un fragmento de DNA genómico de *E. histolytica* de 4.5kb (colores verde y ginda). Un fragmento de 1.3kb (color ginda) de la clona EHHSP70\_4.5kb con las enzimas restricción *EcoRI* *PstI* fue subclonado en el plasmido BlueScript SK(-), resultando en la clona EHHSP70\_1.3kb.

## ANALISIS COMPUTACIONAL DE LA SECUENCIA OBTENIDA.

El análisis de homología a nivel de aminoácidos y nucleótidos de la secuencia obtenida de la clona EHHSP70\_1.3Kb contra los bancos de datos públicos (GeneBank, SwissProtein, EMBL, EMBLupdate, PDB, SPupdate, PIR, GenPept, GPupdate) se realizó utilizando los programas BLASTX1.4.7MP (Gish, 1993 y Altschul, 1990) y BLASTN 1.4.7MP (Altschul, 1990) por medio de correo electrónico (blast@ncbi.nlm.nih.gov).

La búsqueda del marco correcto de lectura se realizó con la herramienta "CodonPreference" del paquete de GCG/Winsconsin utilizando la preferencia de uso de codones para *E. histolytica* reportada por Bruchhaus, et al. (1993).

La búsqueda de motivos en la región corriente arriba del ATG se realizó en parte con ayuda de la herramienta "findpaterns" del paquete de GCG/Winsconsin utilizando la base de datos del propio programa.

Alineamientos posteriores se realizaron con el programa GenWorks de Inteligenetics, Inc.

## AI SLAM IENTO DE DNA DE *E. histolytica*.

Se cosecharon cultivos de *E. histolytica* en fase logarítmica, centrifugando a 500Xg durante 10min a 4°C y lavando dos veces con medio TYI sin suero. La pastilla de células se congeló en nitrógeno líquido, al descongelar se agregó amortiguador de lisis (LiCl 2.5M, Tris-HCl 50mM pH7.5, Tritón X100 4%, EDTA 62.5mM) agitando suavemente hasta obtener una suspensión clara.

Enseguida extrajimos dos veces con un volumen de fenol:cloroformo [1:1] y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico [24:1]. Colectamos la fase acuosa y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto. Dejamos secar el precipitado al aire 10 min y resuspendimos en 1 ml de TE (Tris-HCl, 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Agregamos 50µl de RNAsa (10 mg/ml) y se dejó a temperatura ambiente durante 30-60 min. El volumen se llevo a

7.7ml con TE y se agregaron 8gr de CsCl y 300 µl de BrEt (5mg/ml). Centrifugamos (centrífuga Beckman TLX100 en el rotor TL100.4) a 100,000rpm/8hrs/22°C/desaceleración cero. Terminando el proceso de centrifugación se visualizó la banda de DNA con luz UV ( $\lambda$  larga), se perforó con una aguja del N°16 y se succionó con una jeringa. Se extrajo 2 veces el BrEt con 1 volumen de isopropanol. Precipitamos a temperatura ambiente con etanol a 70% y resuspendimos en 0.2-2ml de TE. Se analizó la calidad del DNA obtenido en un gel de agarosa a 0.8-1% en TAE.

#### **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE DNA GENOMICO.**

La concentración de los DNAs de amiba se determinó por un método que consiste en el uso de un colorante (YOPRO-1) de Molecular Probes, que fluoresce cuando se intercala en el DNA. En un volumen final de 200 µl por pozo de una placa HRP (Nunc) de 96 pozos, se colocaron 45µl de colorante YOPRO-1 (1 µM) y 155µl de la muestra de DNA en TAE1X, se mezclaron y se midió la fluorescencia en un aparato Cytofluor 2300 (Millipore), con una excitación a 491 nm y una emisión a 509 nm.

En cada ensayo se utilizó una muestra blanco sin DNA y otras con cantidades conocidas de pBR322 en las misma condiciones que la muestra problema. Los resultados se reportaron en unidades de fluorescencia y la concentración de DNA problema fue calculada por interpolación en la gráfica del DNA control.

#### **OBTENCION DE RNA DE *E. histolytica***

De acuerdo con el protocolo descrito por Zurita et al, 1987, se cosecharon amibas en fase logarítmica. Las amibas se lavaron 2 veces con medio TYI-S-33 sin suero. Las células se lisaron con 1 ml de Isotiocianato de guanidina 5M (en agua DEPC) homogenizando vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm/5' a temperatura ambiente.

Recuperamos el sobrenadante y se precipitó dos veces con 0.3 volúmenes de etanol absoluto (-20°C por 45min. Max.). El precipitado fue resuspendido en TE y se extrajo dos veces con un volumen de fenol/cloroforno [1:1]. El RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.7 y 2.5 vol de etanol absoluto. Se resuspendió en TE, y se analizó la integridad de RNA por electroforesis en un gel al 1.5% de agarosa en TAE.

## **ENSAYO TIPO SOUTHERN.**

Realizamos digestiones de 10 µg de DNA con las enzimas *EcoR1* y *EcoR1/Pst1* respectivamente. Posteriormente El DNA se fraccionó en un gel de agarosa al 1% y se trató de acuerdo al protocolo reportado por Ausubel, et al. (1992) para transferirlo a membrana de nylon (Hybond N+) en un amortiguador alcalino. Posteriormente, se hibridó con oligos específicos (RHHSPDIF25 o RH3HSP) o con un producto de PCR de 750pb de la clona HSP4.5kb, marcado con <sup>32</sup>P en el extremo 5' con polinucleótido cinasa del fago T4. La fosforilación se llevo a acabo usando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATPy el marcaje por PCR usando [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Johnson 1992).

En los experimentos que usamos los oligos RHHSPDIF25 o RH3HSP como sonda, hibridamos de acuerdo al protocolo reportado por Kafatos et al, (1979). Cuando utilizamos el producto de PCR, se hibridizó por 18hrs a 42°C en formamida 50%, 5X SET (125mM NaCl, 750mM Tris-HCl pH7.4, 0.5mM EDTA), 1X Denhardts.

## **PRIMER EXTENSION**

A 30µg de RNA total se adicionaron 5 pmol de oligo RHATG20 (fosforilado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP), 2 µL de amortiguador de hibridación 5X (Pipes 50mM pH 6.4, NaCl 0.5M) en un volumen final de 10µl. La mezcla se desnaturalizó a 75°C por 5 min y se puso en hielo seco/etanol; enseguida se descongelo lentamente y se incubó por 3 h a 42°C. La mezcla de RNA/oligo

se extendió con 30 U de Transcriptasa Reversa (AMV-RT de Promega) en un volumen de 25  $\mu$ l (con Tris-HCl 50mM pH8.3,  $MgCl_2$  50mM, espermidina 0.5mM, DTT 50mM) incubando 1h/42°C. La reacción se paró con 1 $\mu$ l de EDTA 0.5M pH8, se agregaron 50  $\mu$ l de RNAsa (10 mg/ml), después de 30 min/37°C se extrajo una vez con fenol:cloroformo (1:1). El producto de extensión se precipitó con 9 volúmenes de etanol, 5  $\mu$ g de tRNA y 2 volúmenes de acetato de amonio 4M (-20°C/8hrs). El RNA se lavó con etanol al 70%, se secó en vacío y se resuspendió en amortiguador de corrida (formamida 99%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0.5% y xilen cianol 0.5%).

El producto de "primer extension" se analizó en un gel de secuencia junto con una reacción de secuencia con el oligo universal (-40) sobre el templado de M13 de cadena sencilla determinando de esta manera el tamaño del producto de extensión.

#### **RT-PCR.**

Se trató RNA total para remover DNA contaminante. Se incubaron 50  $\mu$ g de RNA con 10U de DNAsa (libre de RNAsa) junto con 1U de RNAsin en Tris-HCl 100mM pH 8.3, KCl 0.5M,  $MgCl_2$  15mM en un volumen de 20 $\mu$ l por 30min/37°C. Enseguida el RNA se extrajo 2 veces con fenol:cloroformo [1:1] y una vez con cloroformo:alcohol Isoamílico (24:1). Precipitamos el RNA con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 4.7 y 2.5 vol de etanol absoluto. Resuspendimos en TE y analizamos la integridad del RNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE.

Para cada reacción de RT-PCR (Aatsinki, et al, 1994) se utilizó 1 $\mu$ g de RNA (libre de DNA), al que se le agregaron 50pmol de oligos RHDIF.INV y RH4HSP24 y 1 U de RNAsin (Promega) en un volumen final de 22  $\mu$ l. Enseguida se desnaturalizó el RNA incubando por 15 min. a 65 °C. Posteriormente a la reacción se le agregaron 10 $\mu$ l de buffer de PCR 10X (Boeringer Mannheim), 8  $\mu$ l de dNTP's (2.5 mM), 5 U de RT-AMV, 1.25 U de Taq polimerasa en un

volumen final de 100µl y se incubó a 42 °C / 1 hr y a 95 °C / 1 min. Posteriormente, a cada reacción se le agregaron 5 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y se amplificó por PCR a 94°C/ 1min; 30 ciclos a [94 °C / 45 seg; 55 °C / 1min; 72 °C / 1 min] y un paso de extensión final 72 °C/ 7min. Los productos amplificados se analizaron en un gel de poliacrilamida al 7% no desnaturalizante. Se secó a 80°C/1hr con vacío. El gel se expuso por 2hrs y se reveló en el Phosphorimager (Molecular Dynamics)

### **ENSAYO TIPO Northern BLOT**

30µg de RNA PolIA\* y 700ng de RNA polIA\* fueron separados en un gel de agarosa al 1.2% conteniendo formaldehído 2.2M; al terminar la electroforesis se lavó con agua tratada con DEPC durante 1h y se equilibró con 10 X SSC. Posteriormente, el RNA se transfirió por capilaridad en SSC 10 X a una membrana de nylon (Hybond N+, de Amersham) durante 16hrs. Después, se fijó el RNA a la membrana mediante 2 pulsos de luz UV de 12 segundos utilizando el aparato Stratalinker de Stratagene y posteriormente la membrana se horneó a 80°C durante 1hr. El filtro se hibridó independientemente con los oligos RH4HSP y RHHSPDIF25 marcados en el 5'-terminal con polinucleótido cinasa del fago T4 y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP. La prehibridación e hibridación se realizaron en SSPE 1.5X, PEG al10%, SDS al 7%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón y 250mg/ml de heparina a 28°C durante 48hrs. El filtro se lavó 2 veces durante 30 min a temperatura ambiente con una solución de SSPE 2 X y SDS 0.2 % y se expuso por 8 h y se reveló en el Phosphorimager.



# RESULTADOS

## SECUENCIACION Y ANALISIS DEL INSERTO DE LA CLONA EHHSP70\_1.3kb.

La clona HSP1.3Kb se secuenció como se describe en Materiales y Métodos. El contingente de las diferentes lecturas y la secuencia nucleotídica obtenida de éste se resumen en la Figura 3.

El análisis de la secuencia por medio del programa "Codonpreference" (Figura 4) para localizar marcos de lectura abierta, indicó que un marco continuo de lectura abierta, empezaba a partir de la posición del nucléotido 613 y continuaba hasta el final de la secuencia (nt 1327). La traducción deducida de este marco de lectura se muestra debajo de la secuencia nucleotídica de la Figura 3.

Tanto la secuencia de nucleótidos obtenida como su correspondiente secuencia de aminoácidos deducida se utilizaron para la búsqueda de secuencias similares en los bancos de datos públicos utilizando las herramientas de los programas de computación BLAST de NCI por E-mail y GenWorks. Se encontro que la homología más alta (85%) fué con la proteína deducida del gene ENHSP70A de *E. histolytica* (Ortner, et al. 1992) y con un menor porcentaje de homología le siguieron las proteínas heat sock de *Candida albicans* (75%), y 72% de homología para las heat sock de bovino, de humano y de ratón. Mientras que a nivel de nucléotidos, la homología mas alta (85%) fue también con ENHSP70A (Figura 5).

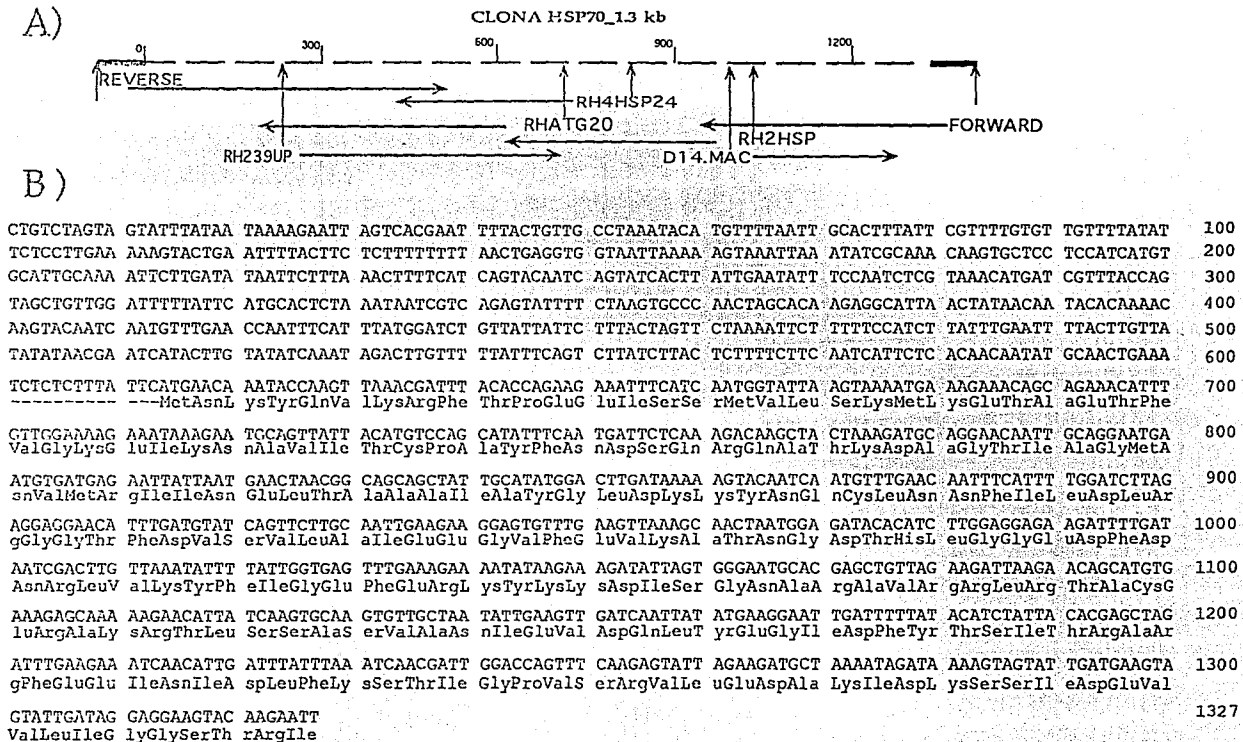
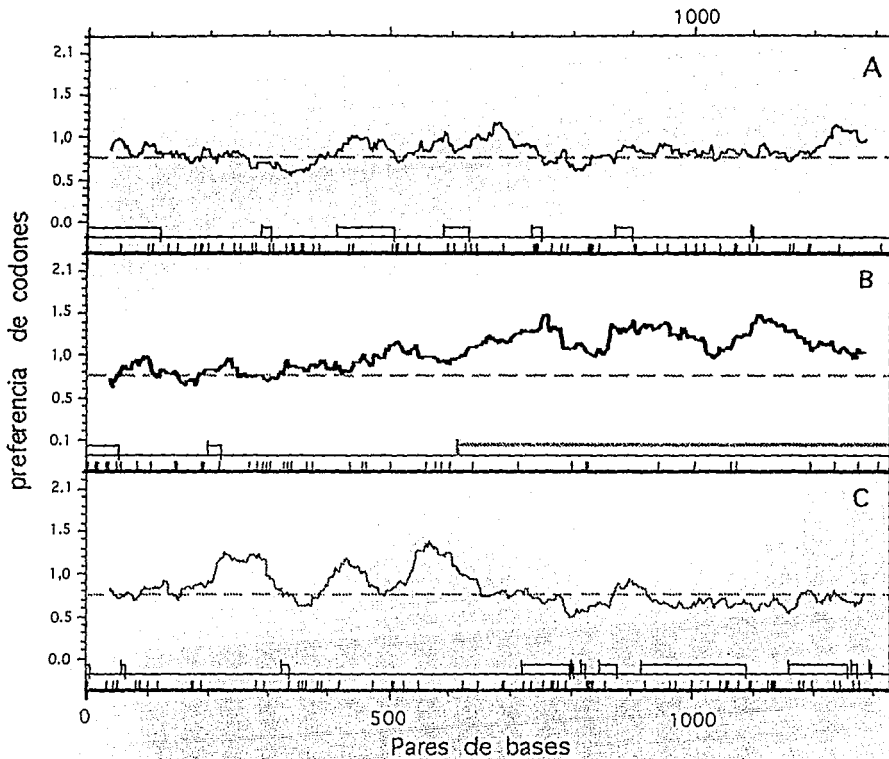


FIGURA 3. A) Contingente de las lecturas con los diferentes oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la clona RHSP70\_1.3kb. B) Secuencia nucleotídica de la clona RHSP70\_1.3kb y secuencia peptídica deducida para su marco de lectura más probable.



Promedio del uso preferencial del uso de codones para el marco 1 (panel A) = 0.8283  
 Promedio del uso preferencial del uso de codones para el marco 2 (panel B) = 1.0098  
 Promedio del uso preferencial del uso de codones para el marco 3 (panel C) = 0.8039

Promedio del uso preferencial del uso de codones para una secuencia al azar = 0.7613  
 Umbral de codon poco usado = 0.1

Figura 4.- Gráfica del análisis del uso preferencial de codones de la secuencia obtenida de la clona EHHSP70.1.3Kb. Se muestra un marco de lectura abierta en el marco de lectura 2 (panel B, línea naranja) utilizando preferentemente (101%), los codones para amiba. El umbral mínimo de preferencia está representado por la línea verde punteada y los pocos codones irregulares se indican con líneas verticales.

ENHSP701.3kb	CTGTCTAGTA GTATTATATA TAAAGAATT AGTCACGAAT TTTACTGTG CCTAAATACA TGTTTTAAT GCACITTTAT CGTTTGTGT TGTTTTATP	100
ENHSP701.3kb	TCTCCTTGAA AAGACTAGTA ATTTTACTTC TCTTTTTTT AACTGAGGGT GTAATTAADA AGTAAATTA ATATCGCAAA CRAAGTCTCC TCCATCATGT	200
ENHSP701.3kb	GCATTCGAAA ATTCCTGATA TAAATCTTTA AACTTTTGT CAGTACAATC AGTATCACTT ATTGAATATT TCCAACTCCG TAAACATGAT CGTTTACCAG	300
ENHSP701.3kb	TAGCGTGTGG ATTTTATGTC ATACATA -C TAAATA -TTC G - -SCAG - - -AGTAT -T TTTATGTC C CACATGAC AG -AGCGAT TACTATAAG	388
ENHSP70A	----- AAAC ATTAATAGAG TAAATAACA GGACCAGCCG TTGTATTGA TTTAGTACT ACATATTAC GTTGGGTAT CTGGCAATAC	84
ENHSP701.3kb	ATAATA -CA AALCAI -E T -CAATCAA HT -TTEAA C -EATTTTC ATTTAT EGA T - -TIGEA T -TATCTE TACT -AG -E T -TAAA -I	466
ENHSP70A	GATATGTTG AATATATTC TAAATATCAA GGAATAGAA CAGCACCATC ATATGTTTCA TTTACTGATA CAGATAGACT TATTTGAGTT CAGCAAGAT	184
ENHSP701.3kb	TCTTTTTC ATCTATATC AATTTTATC TCTTATATC AACGALATCA TACTTCTTCA TCAATAGAC TTTTTTTT TCTATCTTA TTTTACTTT	564
ENHSP70A	ACCTAAATTC AATCAATCT AATCAACTB TATTTGATBC AATCAATTA AATCAATTA AATTTAGTG ACTTCAAGT TCAAAATTA TCTAAAL -A	281
ENHSP701.3kb	TTCTCAATC ATCTCA -CA ACAAATGCA ACTGAATTC TCTTTTAT CATCA -ACAA ATCCAGAT AACCGATTA CACCAGAGA AATTTATCA	661
ENHSP70A	TTGGCAATC AAGCTTATG ATGATGGACA TGATAAACA TTAATTAAG TGAATACAA AAGCAAGT AAGAAATTA CACCAGAGA AATTTATCA	381
ENHSP701.3kb	ATGGTATTA TAAATAGAA AGAATACGA GAATCATTC TTGGAAAGA AATAAAGAT GCAGTATTA CATGCCAGC ATATTCAAT GATTCTCAAA	761
ENHSP70A	ATGGTATTA TAAATAGAA AGAATACGA GAATCATTC TTGGAAAGA AATAAAGAT GCAGTATTA CATGCCAGC ATATTCAAT GATTCTCAAA	481
ENHSP701.3kb	TACAAGTAC TAAAGATCA GGAACAATG CAGGAATGA TGTATGAGA ATTATTAAT AACCACTC AGCACTATT GCATATGAC TTAGATAAAA	886
ENHSP70A	TACAAGTAC TAAAGATCA GGAACAATG CAGGAATGA TGTATGAGA ATTATTAAT AACCACTC AGCACTATT GCATATGAC TTAGATAAAA	581
ENHSP701.3kb	TACATACAA TGTTTGACA ATTTCAATTT GACTTTTGA GGAGAACAT TTGATGATC AATCTTCCA ATTGAAAG GAGTGTGA AGTAAAGCA	961
ENHSP70A	GAGTGTACA GAAAGAAC TTTTATTT GACTTTTGA GGAGAACAT TTGATGATC AATCTTCCA ATTGAAAG GAGTGTGA AGTAAAGCA	681
ENHSP701.3kb	ATTAATGGAG ATACATATC TGGAGGAAA GATTTGATA ATCACTTCT TAAATTTT ATTTGAGAT TCAATGAAA ATATAAGAAA GATATTAGT	1061
ENHSP70A	ATTAATGGAG ATACATATC TGGAGGAAA GATTTGATA ATCACTTCT TAAATTTT ATTTGAGAT TCAATGAAA ATATAAGAAA GATATTAGT	781
ENHSP701.3kb	GGATGCAGC AGCTGTTAGA AGATTAAGAA CAGCATGTGA AAGAGCAAAA ACAACATTAT CAAGTCCAG TCTTCTAAT ATTGAAGTT ATCAATTATA	1161
ENHSP70A	GGATGCAGC AGCTGTTAGA AGATTAAGAA CAGCATGTGA AAGAGCAAAA ACAACATTAT CAAGTCCAG AACCCTAAT ATTGAAGTT ATCAATTAT	881
ENHSP701.3kb	TGAAGAAAT GATTTTATA CATCTATTAC ACGAGCTAGA TTTGAGAAA TAAATATGA TTTATTTAAA TCAACGATG GACCACTTC AAGAGTATTA	1261
ENHSP70A	TGAAGAAAT GATTTTATA CATCTATTAC ACGAGCTAGA TTTGAGAAA TAAATATGA TTTATTTAAA TCAACGATG GACCACTTC AAGAGTATTA	981
ENHSP701.3kb	GTAGATGCTA AATAGATAA AATAGATTT GATGAATAG TATGATAGG AAGAAATACA AGAATTTA -----	1327
ENHSP70A	GTAGATGCTA AATAGATAA AATAGATTT GATGAATAG TATGATAGG AAGAAATACA AGAATTTA -----	1081
ENHSP70A	ATGGAAAAG ACCAAACAA ATGATTAATC CAGATGAGC AGTTGATAT GGAGCAGCAG TATCAAGCAG TATCTAATC GGAACCGGAG GAAAGCAAC	1181
ENHSP70A	AGAAATGTG TTTATCTCT ATGTTGCACC ACTTACACTT AGAATAGAAA CAGCAGGAGG AGTATGACA GCATTAATTC CTAGAAATTC AACAAATCCA	1281
ENHSP70A	GCALAAAGAT CACAAGTAT CTCTACATAT CGACGAAATC AACCAGGAT ATTAATCAA GTATTTGAG GAGAAGCAT AATGACAAC CATGTAAT	1381
ENHSP70A	TACTTGGAAA ATCTGATTA ACAGGAATAC CACCACACC ACGAGGACTA CACAATAAG AAGTTACAT TGATATTGAT CCAATAGTGA TTTTGAATG	1481
ENHSP70A	TTCAGCAGAA GATAAAACAA CTGGAAGAA GAATAAGATT ACTATTACTA ATGACAAAGG AAGATTAAGT AAGAACAA TGTATAAGT GGTAGCAGAA	1581
ENHSP70A	CGTGAATAT TCAAGGACA AGATGATAAG ATGAACAAA GAGTCCAGG AAGAAATAAG TTAGAAATCT TCTGTTATC AGTCAAGAT ACTCTTAGT	1681
ENHSP70A	AACAATTCG TGATAAGAT GCTCGCAGAG AFAAGACTAC TATTGAGATT ATTGTTAAG AACCTTGA TTGGATTAT AGCAATCAA ATGCTTCCAC	1781
ENHSP70A	TGAAGATAT GATACAGAA TGAAGAGAT TGAAGAAA GTCCACCAA TTTTCACTA CACTATCAA CAGCCGGAG CTGCTGGTG AATGCCAGA	1881
ENHSP70A	GGAAATCCAA ATGATTTCCC AGGTCTGGA GCTGCTCAC AAGGTAACC TCAACCAAAG TCAAGCGGAA AAGGACCAAC TATTGAAGAA GTTGATTA	1981
ENHSP70A	TGAGTTAAAT GGTTTT	1997

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 5. Alineamiento de las secuencias de la clona EHSP70\_1.3kb y EHSP70A. Se muestra, además, la posición de los oligonucleótidos que fueron utilizados para varios procedimientos en este trabajo. Nótese que algunos de ellos son comunes, mientras que otros son específicos para cada secuencia génica.

## SITIOS DE RECONOCIMIENTO PARA FACTORES TRANSCRIPCIONALES.

Con el programa "FindPatterns" del paquete GCG, se analizó la secuencia de la clona EHSP70\_1.3kb buscando motivos secuenciales reportados en la base de datos de factores de transcripción (1991). En la Figura 6 se muestran los resultados de algunos motivos secuenciales relacionados con las hsp's como el **cNNGaNNttcNNG** y **ctNGaaNNttcNNGaaNcNNgaANNttcNNG** definidos como HSE (elemento de choque térmico) que une a la proteína llamada factor de choque térmico [HSF] (Pelham, 1985; Xiao H. et al. 1988) estas secuencias consenso no aparean de manera perfecta por dos bases, respectivamente. En la Tabla 2, las secuencias "NGAANNTTCN" propuestas como motivos principales de HSE en eucariotes (Pelham, 1985; Xiao H. et al. 1988), se compara con las secuencias propuestas para otros parásitos donde se observa una parcial conservación dependiendo del gene y del organismo, por lo que es posible que existan variaciones del consenso original en los parásitos y sobre todo en *E. histolytica*.

**TABLA 2.** Secuencias postuladas como elementos HSE en los genes de choque térmico en parásitos\*

CNNGAANN--TTCNNG	HSE EUCARIOTAS (Pelham, 1985)	
aTTGAATAtTTCcAa	HSE1 (Figura 6)	
tTCcAAAA--TTCTTG	HSE2 (Figura 6)	FALLA DE ORIGEN
aTCcAACT-gcaGCc	HSE hsp70 <i>T.brucei</i> (Glass et al. 1986)	
CGGcACTT--TTCCGG	HSE hsp70 <i>T.cruzi</i> (Requena et al. 1989)	
CAAGcACA-TaCTCG	HSE hsp70 <i>T.cruzi</i> (Gwo-Shu et al. 1990)	
gCGGAAT--TTCAAa	HSE hsp70 <i>T.cruzi</i> (Gwo-Shu et al. 1990)	
gAAaAAAA--TTCCAG	HSE hsp70 <i>T.cruzi</i> (Gwo-Shu et al. 1990)	
CCTaAACA--cccACT	HSE hsp70 <i>L.major</i> (Gwo-Shu et al. 1988)	
CAGaAAAG--TTgCCa	HSE hsp70 <i>T.annulata</i> (Mason et al. 1989)	
CCTTAAGT-gTCAAc	HSE hsp70 <i>T.annulata</i> (Mason, et al. 1989)	
COGcAACT-gTgCGc	HSE hsp83 <i>T.cruzi</i> (Dragon, et al. 1987)	
CTGaAACT-gaTTCa	HSE hsp83 <i>T.brucei</i> (Zwierynski, et al. 1989)	
CTGcATTC-aTgCAG	HSE ubiquitina <i>T.cruzi</i> (Swindle, et al. 1988)	

\*En minúsculas los nucleótidos no homólogos al consenso del HSE en eucariotes. □ = Motivos perfectos fuera de la posición esperada. (Tabla modificada de Requena, et al. 1993).

-508	CTGTCTAGTAGTATTTATAATAAAAAGAAATTAGTCACGAATTTTACTGTTG	50
-458	CCTAAATACATGTTTTAATTGCACATTTATTCGTTTTGTGTTGTTTATAT	100
-408	TCTCCTTGAAAAAGTACTGAATTTTACTTCTCTTTTTTTTAACTGAGGTG	150
-358	GTAATTTAAAAGTAAATTAATATCGCAAACAAGTGCTCCTCCATCATGT	200
	cNNGaNNTtcNNG	
-308	GCATTCGAAAAATCTTGATATAAATCTTAAACTTTTCATCAGTACAATCT	250
	NgaaNNTtcNNGaan	
	ctNgaaN-Nttcnag	
-258	AGTATCACTTATTGAATATTTCCAATCTCGTAAACATGATCGTTTACCAG	300
-208	TAGCTGTTGGATTTTTATTTCATGCACCTCTAAATAATCGTCAGAGTATTTT	350
-158	CTAAGTGCCCACTAGCACAAAGAGGCATTAACATAACAATACACAAAAC	400
-108	AAGTACAATCAATGTTTGAACCAATTCATTTATCGGATCTGTTTATTATTC	450
	TATTTAAA	
-58	TTTACTAGTTCATAAAATTCTTTTCCATCTTATTTGAATTTTACTTGTTA	500
	-28	
	ta	
	ta +1 atcat	
-8	TATATAACGAATCATACTTGTATATCAAATAGACTTGTTTTTATTTCAAGT	550
	tatataa	
+42	CTTATCTTACTCTTTTCATTCATCTCACAAACATATGCAACTGAAA	600
	atg	
+92	TCTCTCTTTTATTCAGAACAAATACCAAGTTAAACGATTTACACCAGAAG	650
+142	AAATTTTCATCAATGGTATTAAGTAAAAATGAAAGAAAACAGCAGAAAACATTT	700
+192	GTTGGAAAAGAAAATAAAGAAATGCAGTATTACATGTCCAGCATATTTCAA	750
+242	TGATPCTCAAAGACAAAGCTACTAAAGATGCAGGAACAATTCAGGAATGA	800
+292	ATGTGATGAGAATTATTAATGAACTACGGCAGCAGCTATTGCATATGGAC	850
+342	TTGATAAAAAGTACAATCAATGTTTGAACAATTTTCATTTTGATCTTTAGA	900
+392	GGAGGAACATTTGATGATCAGTTCFTTGCAATTGAAGAAGGAGTGTTFGA	950
+442	AGTTAAAGCAACTAATGGAGATACACATCTTGGAGGAGAAGATTTTTGATA	1000
+492	ATCGACTTGTAAATATTTTATTGGTGAGTTTGAAAGAAAATATAAGAAA	1050
+542	GATATTAGTGGGAATGCACGAGCTGTTAGAAGATTAAGAACAGCATGTGA	1200
+592	AAGAGCAAAAAGAACATTATCAAGTGCAGTGTGCTAATATTGAAGTGG	1300
+642	ATCAATTATATGAAGGAATTGATTTTTTATACATCTATTACACGAGCTAGA	1350
+692	TTTGAAGAAAATCAACATTTGATTTTATAAATCAACGATTGGACCAGTTTC	1400
+742	AAGAGTATTAGAAGATGCTAAAAATAGATAAAAAGTAGTATTGATGAAGTAG	1450
+792	TATTGATAGGAGGAAGTACAAGAATTT	1476

FIGURA 6. REGION PROMOTORA DE EHS<sub>P70</sub>.1.3kb. Localización de los siguientes motivos en la secuencia 5' corriente arriba del ATG de inicio de la traducción. +1=Sitio inicio de transcripción obtenido experimentalmente. TATTTAAA =tata-box -28pb (Bruchhaus et al. 1993). TTTCA = consenso del líder en *E. histolytica* (katyar, et al. 1995). atg =Metionina#1. cNNGaNNTtcNNG NgaaNNTtcNNGaan ctNgaaN-Nttcnag =Sitios de reconocimiento para factores de transcripción de choque térmico en eucariotes. (Pelham, 1985 y de acuerdo al programa findpaterns del paquete GCG Wisconsin).

## EL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN Y OTROS MOTIVOS DE LA REGIÓN 5'-NO CODIFICANTE

Para mapear el sitio de inicio de la transcripción se utilizó el oligo RHATG para experimentos de "primer extension" utilizando transcriptasa reversa y RNA total y RNA total tratado con RNAsa. La Figura 7 muestra como resultado un producto de extensión de 134nt y por lo tanto un líder de 104nt a partir del ATG putativo. El tamaño se calculó por los marcadores de referencia pBRmsp1 y la secuencia de M13cadena sencilla.

Manualmente se localizó una secuencia homóloga a la caja tata [TATTTAAA] reportada en *E. histolytica* previamente por Bruchhaus, et al. (1993) a una distancia de -28 a partir del sitio de inicio de la transcripción, al igual que la secuencia consenso atcat cercana a el sitio de inicio de la transcripción. (Bruchhaus, et al. 1993.) y una secuencia consenso (t)tca. (Katiyar, et al. 1995) dentro de la secuencia líder (Figura 6).

Estos motivos secuenciales de la región 5'-no codificante agrupan la región líder 5' de EHHSP70\_1.3kb junto con las secuencias líder de otros genes de amiba en las cuales se han descrito estas secuencias consenso y además se ha definido el tamaño de su líder 5' como se muestra en la Figura 8. En este caso la clona EHHSP70\_1.3kb comparte la caja tata a una distancia similar de -30nt del sitio de inicio de la transcripción, aunque la clona EHHSP70\_1.3kb difiere del grupo por la longitud de su líder (107nt) ya que la mayoría de los genes de amiba tienen un líder corto de 7 a 15 nt. Por otra parte solo se ha descrito un líder de 76pb para el gene de la cadena pesada de la miosina (Raymond-Denise, et al. 1993).

Existen además otras secuencias líder que no contienen un obvio



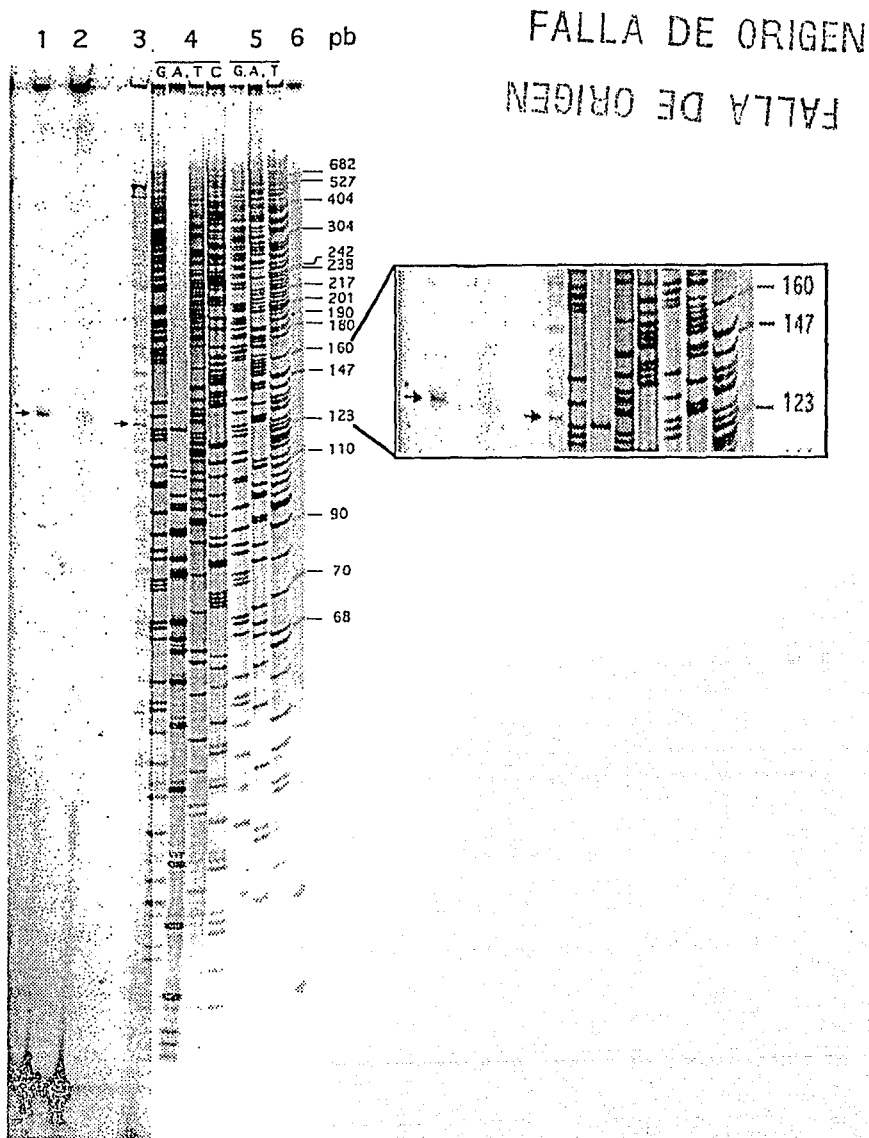


FIGURA 7. Análisis del sitio de inicio de la transcripción de la clona EHHSP70\_1.3kb por "primer extension". Carriles 1-3 "primer extension" con el oligo (específico de EHHSP70\_1.3kb) RHATC20 kinado ( $^{32}P$ ). Carriles: 1. RNA total de ameba; 2. RNA total de ameba tratado con RNAsa; 3. (control negativo) igual que el carril uno pero el marcaje del producto fue por incorporación de  $\alpha$   $^{32}P$ -dATP (la flecha indica un producto principal de 124nt); carriles 4 y 5 corresponden a secuencia de M13ss con el oligo forward -40 con  $\alpha$   $^{32}P$ -dATP; 6. marcador de PM (pBR322/Msp1) kinado con  $^{32}P$ .

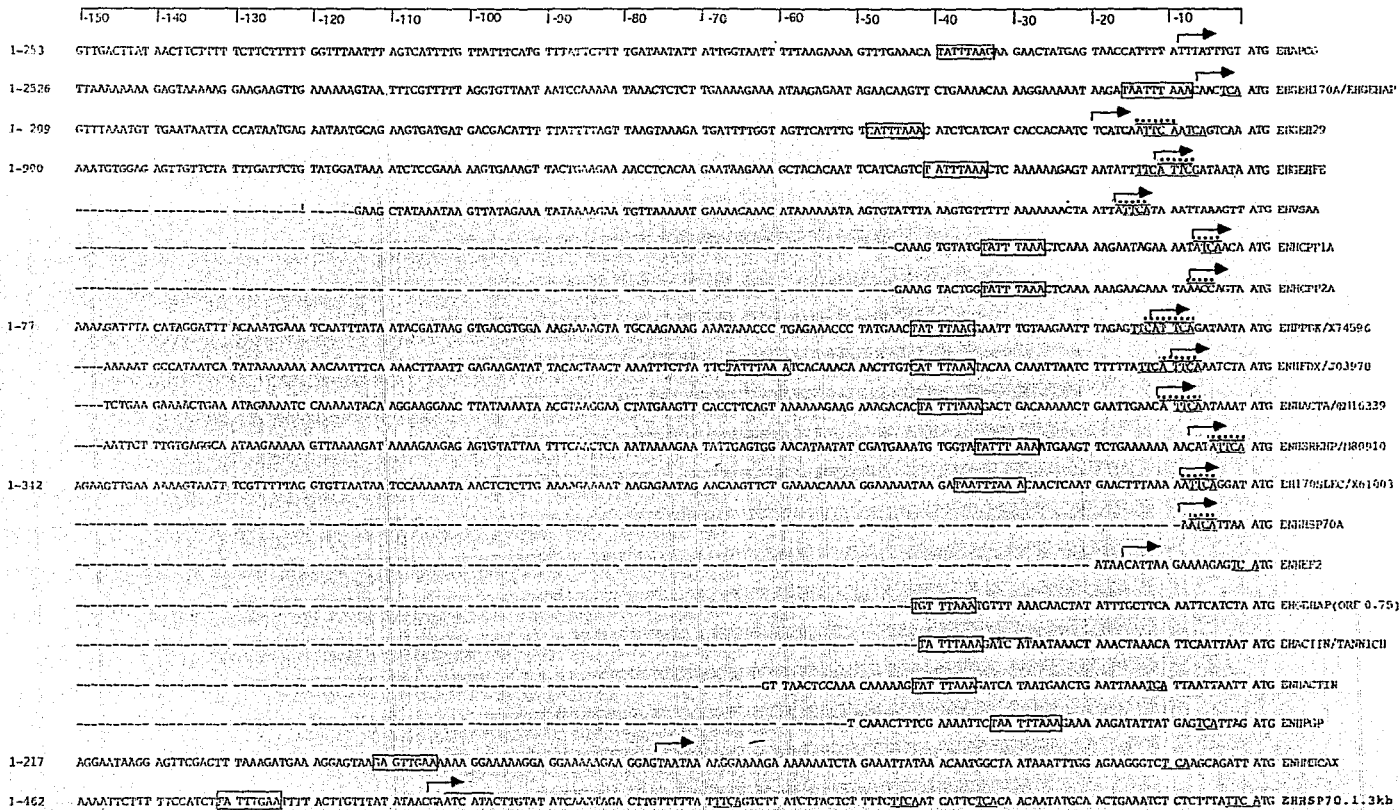


FIGURA 8. REGIONES CORRIENTE ARRIBA DEL PRIMER ATG DE VARIOS GENES DE *E. histolytica*.

Los motivos encerrados en una caja contienen secuencias tipo TATA (Bruchhaus M. 1993). La secuencias consenso en el líder (T)TCA (Katiyar, et al. 1995) estan subrayadas. El sitio de inicio de la transcripción se marca con una flecha (r→). Los motivos conservados en el sitio de inicio de la transcripción (Bruchhaus, et al. 1993) se identifican por una línea superior discontinua (ATTCA o ATCA). El nombre de acuerdo al GenBank esta del lado derecho. Solo se muestran ≤150nt del total de la secuencia reportada. En el lado izquierdo se enumeran el resto de cada secuencia. Todas las secuencias fueron obtenidas del GenBank.

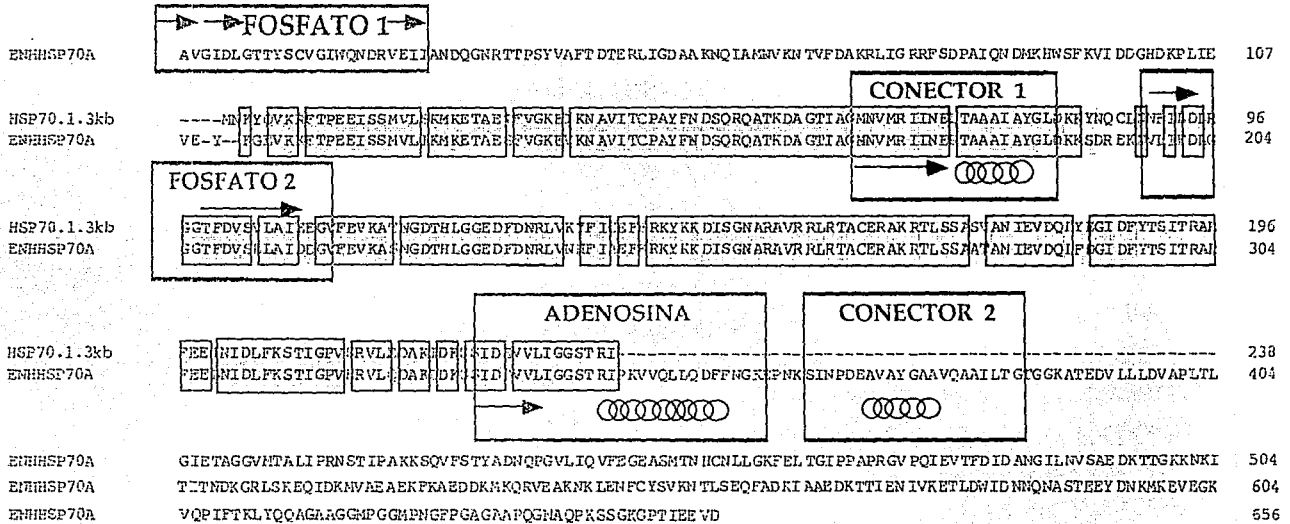
consenso correspondiente a secuencias regulatorias eucarioticas.

## ANALISIS DEL DOMINIO DE UNION AL ATP.

La secuencia peptídica deducida para el gene EHHSP70\_1.3kb se analizó en la región de homología correspondiente a los motivos estructurales del sitio de unión al ATP las HSPs (Bork, et al. 1992. ). En la Figura 9, se observa que la secuencia de la clona hsp1.3kb no contiene el motivo donde se une el **fosfato 1** ( $\alpha$ ) del ATP. Los motivos **conector 1** y **fosfato 2** ( $\beta$ ) se encuentran representados totalmente. El dominio correspondiente a la union de adenosina parece estar presente (13 de 27aa). La secuencia de la clona se corta a la mitad del sitio putativo de unión de adenosina. Dado que el **conector 2** se encontraria más hacia el extremo carboxilo terminal, no se pudo determinar su presencia o ausencia. En cada caso se muestra su ubicación en la secuencia de referencia ENHHSP70A.

## ENSAYO DE SOUTHERN BLOT.

En los organismos eucariotes superiores, las proteínas de "estrés" de 70kDa están codificadas por familias de genes con varios miembros. Estas proteínas se localizan en distintos compartimentos celulares: citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico y cloroplastos. Con el objetivo de investigar la organización de los genes de HSP70 en *Entamoeba histolytica*, DNA genómico de la cepa HK9 fue digerido con las enzimas *EcoR1*, *Pst1*/*EcoR1* y *Pst1*. Estas enzimas fueron seleccionadas ya que reconocen más de un sitio en el gene reportado ENHHSP70A y únicamente flanquean las clonas HSP704.5kb y su subclona HSP701.3kb (Figura 10). El DNA digerido se separó en un gel de agarosa y fue transferido a una membrana Nytran N+. El filtro fue hibridado con tres diferentes sondas



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 9. DOMINIO DE UNION AL ATP. Analisis de los motivos secuenciales que unen diferentes partes de la molecula de ATP en las proteinas de choque térmico, de acuerdo con Bork, et al. (1993), para la secuencia peptídica deducida de la clona EHHSP70\_1.3kb y utilizando como referencia la secuencia respectiva de EHHSP70A.  $\rightarrow$  =  $\beta$ -plegada;  $\bigcirc$  =  $\alpha$ -elice.

FALLA DE ORIGEN

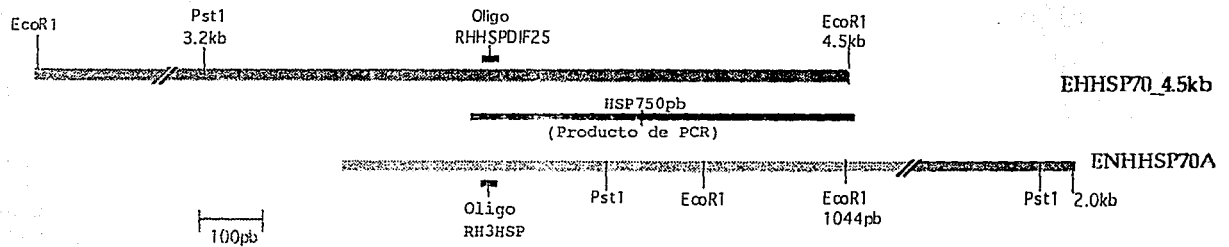


FIGURA 10. Gráfico que ilustra la clona EHHSP70\_4.5kb y el gene ENHHSP70A (Ortner, et al. 1992). Se muestran las restricciones *EcoRI* y *PstI* y las sondas utilizadas en el ensayo tipo "Southern blot". El oligonucleótido RHHSPDIF25 es específico para la clona EHHSP70\_4.5kb; el oligonucleótido RH3HSP reconoce específicamente el gene ENHHSP70A; el fragmento de PCR HSP750pb obtenido utilizando como templado la clona EHHSP70\_1.3kb fué igualmente utilizado como sonda y reconoce tanto el gene descrito en este trabajo como el gene ENHHSP70A.

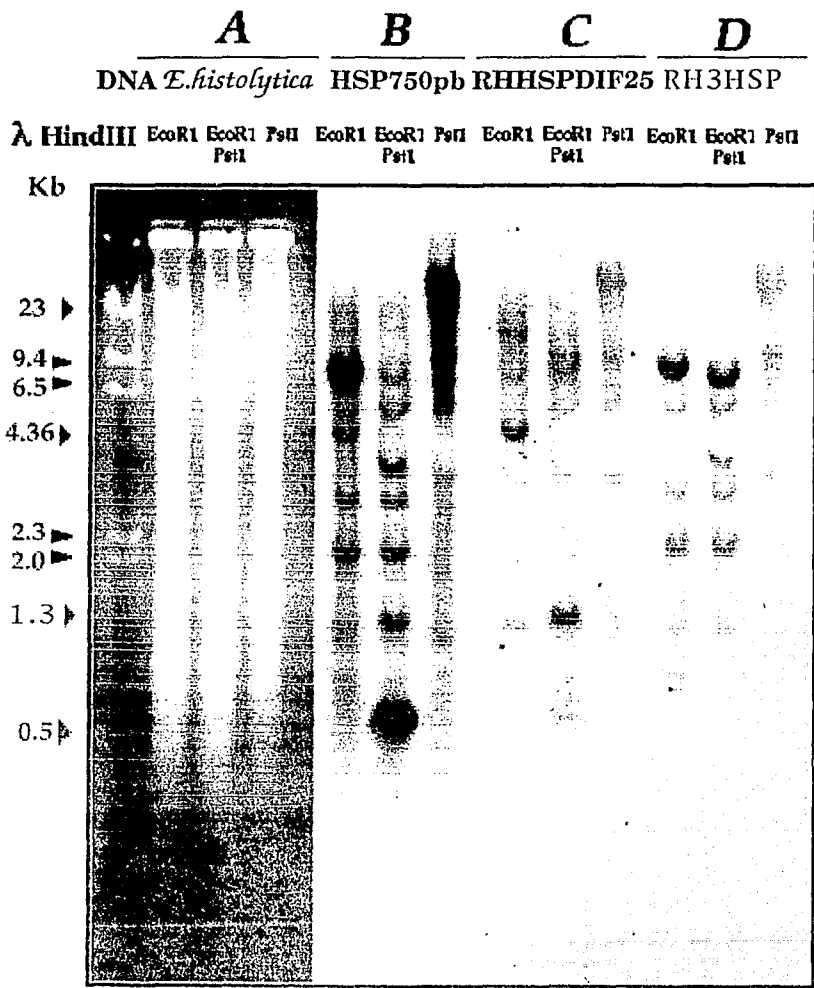


FIGURA 11. ENSAYO DE SOUTHERN BLOT. Panel: A) DNA genómico cortado con *EcoRI*, *EcoRI/PstI* y *PstI* y separado en agarosa, transferido e hibridado con diferentes sondas: B) HSP750pb; C) RHHSPDIF 25y D)RH3HSP.

(Figura 10) seleccionadas por su especificidad: un fragmento marcado por PCR de 750pb (universal de las HSP70) con los oligos HSPDIFINV25 y Forward; en segundo lugar se usó el oligo RHHSPDIF25 (específico de RHHSP70\_1.3kb) y un último oligo RH3HSP (específico del gene ENHHSP70A). Los resultados de la Figura 11, muestran los fragmentos que se predicen sobre el gene ENHHSP70A en la hibridación con la sonda HSP750pb: Con *EcoR1* un fragmento de 295pb (muy débil); con *EcoR1/Pst1* un fragmento de aprox. 500pb; con *Pst1* otro de 1150pb. También están presentes bandas de 4.5kb y 1.3kb en la digestión con *EcoR1* y *EcoR1/Pst1*, respectivamente y que corresponden a nuestras clonas (HSP704.5kb y HSP70\_1.3kb). También son aparentes otras bandas a lo largo del gel con las distintas restricciones que indican la presencia de representantes adicionales de la familia de HSP70.

Con la finalidad de detallar la identificación de los fragmentos se lavó el filtro y se hibridó con la sonda RHHSPDIF25 generando señal únicamente en los tamaños esperados de 4.5kb y 1.3kb, como ya se menciona anteriormente; sólo la digestión con *Pst1* muestra un patrón con un alto peso molecular que no se resuelve.

Por último la sonda RH3HSP generó una serie de tamaños que no se podían predecir; sin embargo se encontró que las bandas de 4.5 y 1.3kb no son reconocidas por esta sonda, lo que demuestra la especificidad de la sonda RH3HSP. Las bandas que fueron reconocidas por la sonda universal de 750pb con un tamaño menor a 2.0 kb son descartadas por este oligo que solo reconoce una región pequeña y cerca del extremo 5' del gene ENHHSP70A. También se reconocen diferentes genes más (al menos 3 o 4), ya que solo una de las bandas en cada digestión podría ser del gene ENHHSP70A y el resto corresponden a genes diferentes.

## ENSAYO DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-PCR.

Los resultados anteriores indican que nuestra clona codifica para una HSP70 atípica por lo que es importante probar su expresión a nivel de RNA. El primer acercamiento fue a través de RT-PCR (Aatsinki, et al. 1994), para lo cual se sintetizó cDNA de a partir de RNA total de amibas sin choque térmico (libre de DNA) con el oligo RH4HSP24 y transcriptasa reversa, con un segundo oligo específico (RHDIFINV25) complementario al cDNA y la enzima *Taq* DNA polimerasa por medio de PCR se amplifica un fragmento de DNA. Los resultados del ensayo (Figura 12) mostraron la amplificación específica de un producto de tamaño esperado de 180pb (carril 1), mientras que los controles de RNA/DNAsa+; RNA/DNAsa- y DNA genómico de *Entamoeba histolytica* en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente se comportaron de acuerdo a lo predicho ya que la ausencia de producto en el carril 2 demuestra que la amplificación del carril 1 es específica del cDNA/RNA y no de DNA (presente en la muestra de RNA) como es el caso del carril 3 y 4. Mientras que los controles de los carriles 5, 6 y 7 utilizando un par de oligos específicos del gene de actina de amiba, mostraron un producto del tamaño esperado de 265pb en las condiciones RNA/DNAsa+ y RNA/DNAsa- y ausencia de producto en el carril 6 (RNA/DNAsa+/RT-) demostrando también que el tratamiento de DNAsa es eficiente y la amplificación específica sobre el cDNA.

## ENSAYO DE "NORTHERN BLOT"

El ensayo de "Northern blot", realizado por la Dra Rosana Sánchez, confirma la expresión encontrada por el ensayo de RT-PCR. El RNA se aisló de amibas sin choque térmico, se fraccionó en una columna de poli-dT. Tanto RNA poli A+ como poli A- se separaron en un gel de agarosa/formaldehído, el RNA se transfirió a una membrana Nytran N+ y



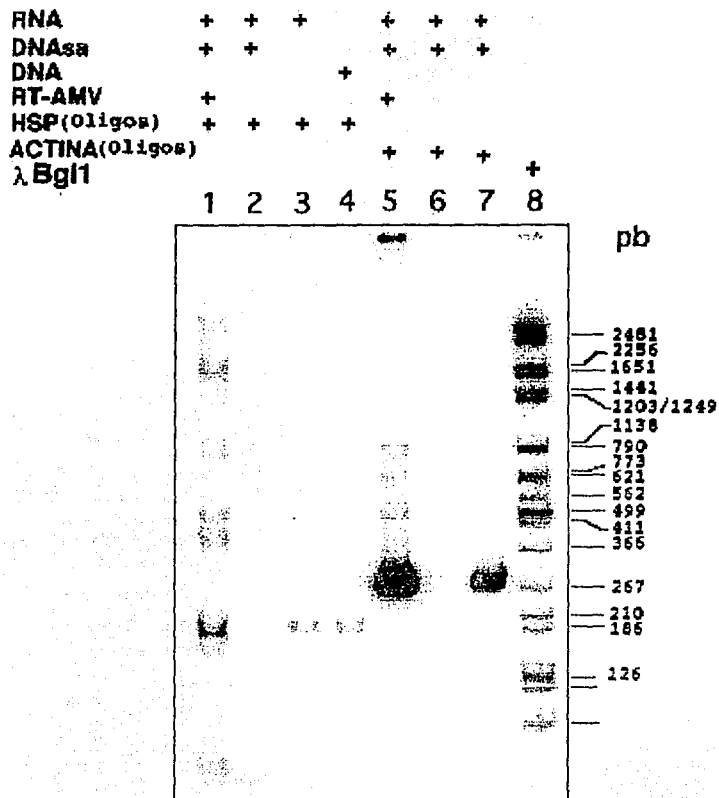
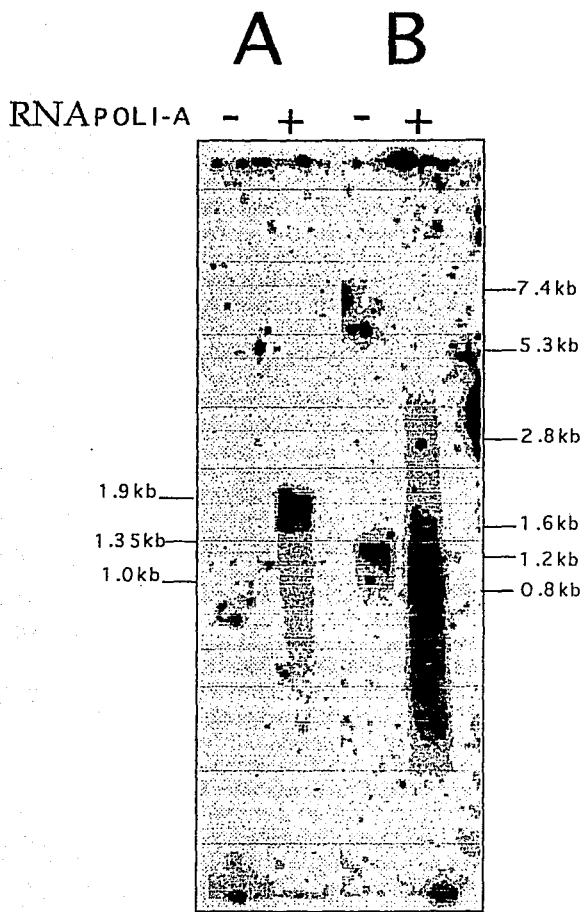


FIGURA 12. ANALISIS DE EXPRESION DE LA CLONA DEL GENE EHHSP70\_1.3KB POR MEDIO DE RT-PCR. Los oligos usados para HSP fueron RH4HSP24 y RHDIF.INV (carriles 1-4); ACTINA 1 y ACTINA2 para actina (carriles 5-7).

se hibridó primeramente con la sonda RH4HSP24 (panel A de la Figura 13) que sirve tanto para detectar el mensajero de ENHHSP70A como el mensajero de HSP70.1.3kb. Se observó señal unicamente en el carril de poliA+ desde 1.6 a 1.9kb que es aproximadamente el tamaño de otros integrantes de la familia HSP70.

Al rehibridar con la sonda RHHSPDIF25 específica (Figura 13, panel B) se detectó señal en distintos tamaños y en ambos carriles. La fracción poliA- mostró bandas con tamaños de 1.35 y 1.0kb, mientras que en la fracción PoliA+ dió dos bandas predominantes de tamaño 1.2 y 0.8kb. Esta variabilidad en la fracción poliA+ puede explicarse en parte por un proceso de desadenilación que sufren los mensajeros de HSP70 en otros organismos (Dellavalle, et al. 1994; Osteryoung, et al. 1993) resultando en una variación en el tamaño de la cola de poliA. La fracción poliA- tiene varios productos de 1.0kb a 1.35kb que corresponden posiblemente a transcritos que aun no sufren el proceso de poliadenilación y que muestran variaciones en el tamaño de la región 3'-no codificante (Berger, et al. 1994) o bien en los que el proceso de desadenilación fue muy intenso. Además la carencia de la secuencia en la región 3'-terminal del gene impide definir si existen en esa región sitios definidos de posibles cambios postranscripcionales que resulten en una variación de tamaños en el mRNA (Yost, et al. 1990) y posiblemente en el producto protéico.



**FIGURA 13. ENSAYO DE NORTHEN BLOT.** Fracciones de RNA poli A+ (700ng) y poli A- (700ng) fueron hibridadas con: A) oligo RH4HSP24 y B) oligo RHHSPDIF25. Los estandares de RNA son 7.4kb, 5.3kb, 2.8kb, 1.9kb y 1.6kb de Boehringer Mannheim.

# *DISCUSSION*

El presente estudio es parte de un proyecto global que trata de describir la presencia de genes involucrados en procesos de tráfico intracelular y secreción de proteínas en *E.histolytica* que han sido descritos en otros organismos eucariotes superiores. Dentro de las funciones de las HSP70, se ha descrito su eficiente papel en la translocación de proteínas a través de las membranas de distintos compartimentos celulares (Craig E., y col 1990; Stuart R.A. y col. 1994); además las HSP70 se localizan dentro de la matriz mitocondrial y en el lumen del retículo endoplásmico (GRP78 o BiP), y son responsables de la translocación y correcto plegado de proteínas locales y de aquellas que utilizan el retículo endoplásmico como vía de secreción.

El gene EHHSP70A y BiP (parcialmente), descritos por Ortner en 1993, a partir de un banco de cDNA, marcaron la posibilidad de describir otros elementos de la familia HSP70 y sus posibles implicaciones en la vida celular de la amiba.

Nuestro trabajo describe la secuencia parcial de un gene (EHHSP70\_1.3kb) [Figura 3] con una alta homología a la familia HSP70 y particularmente al miembro EHHSP70A de *E.histolytica* (Figura 6), pero con ciertas características atípicas. En el mismo reporte de Ortner se menciona la presencia de cDNA's con tamaños más cortos que el esperado por lo que era importante definir las características a nivel genómico. En este caso encontramos que el fragmento EHHSP70\_1.3kb tiene un extremo 5'-terminal por demás corto comparado con la secuencia nucleotídica de EHHSP70A (Figura 5). Consecuentemente, la secuencia peptídica deducida, mostró una región que por ende carece de la región amino terminal de otras HSP70 (Figura 9). La delección en la región amino terminal determina que la EHHSP70\_1.3kb carezca de la región que reconoce el fosfato 1 del ATP (Figura 9).

Por otra parte, se ha realizado un gran esfuerzo por describir y mapear las regiones involucradas en la actividad de unión al ATP en las HSP70 y su repercusión molecular y biológica (Flaherty, MK. y col.1990; Li, CG. y col.1992; Flaherty, MK. y col.1991; Gaut R.J. y Hendershot, M.L. 1993; Bork P. y col.,1992), Haciendo un análisis de los datos de algunos trabajos reportados podemos decir que la delección que muestra este gene no tendría una repercusión del todo negativa, pues delecciones similares, realizadas artificialmente en HSP70's muestran actividad de unión al ATP con la liberación de su sustrato proteico (Gaut R.J. y Hendershot, M.L. 1993) y aún en ciertos casos proporcionan una protección celular durante choque térmico (Li, C.G. y col.1992), así como una correcta localización subcelular de la HSP70 (Milarski KL, Morimoto RI 1989).

También se ha reportado que DnaK realiza ciertos procesos de protección en ausencia de ATP (Skowrya D. y col.1990).

Considerando lo anterior podemos proponer que una proteína de choque térmico derivada de la clona EHHSP70\_1.3kb puede corresponder a una proteína tipo HSP70 con funciones específicas en *E. histolytica*. Punto que queda para futuros estudios. Un ejemplo interesante que puede mostrar la importancia que puede tener este gene en la amiba, es la presencia de una proteína tipo HSP70 pero de menor tamaño de 70kDa en *T. cruzi* que se expresa bajo choque térmico y se transloca sólo al núcleo (Martin F. et al. 1993).

El control transcripcional de HSP en mamíferos esta controlado por factores transcripcionales que actúan sobre secuencias consenso en la región 5' (NGAANNNTTCN). Cabe mencionar que los genes de HSP de parásitos tienen una sola copia de una secuencia similar en la región 5' no codificante; por ejemplo, en *T. cruzi*, HSP83 y ubiquitina y en *T. brucei*. HSP70 y HSP83, (Newport, G.1988.).

La región 5' no codificante de la clona EHHSP70\_1.3kb muestra la

presencia de motivos importantes que coinciden con los HSE de las HSPs de otros organismos protozoarios (Tabla 2) y que han sido descritos como secuencias posiblemente regulatorias de la expresión de proteínas de choque térmico. También en otros eucariotes superiores estos motivos son funcionales aun con una homología menor (Calderwood S. 1990).

También se encontró una secuencia tipo TATA [TATTTGAA] localizada a una distancia de -28pb del sitio de inicio de la transcripción, similar a la descrita por Bruchhaus M. en 1993. (TATTTAAA) y las secuencias TTCA dentro del líder, que de acuerdo con Katiyar (1995), pueden ser importantes en el reconocimiento inicial del transcrito por el complejo ribosomal. Sin embargo, el tamaño del líder en EHHSP70\_1.3kb es más largo, comparado con los líderes descritos en *E. histolytica* (Figuras 6 y 8).

Los elementos descritos anteriormente probablemente estén implicados en la regulación específica de la transcripción del gene EHHSP70\_1.3kb. En condiciones basales, su transcripción es muy baja, como lo indicaron los experimentos de RT-PCR y tipo Northern.

Se ha propuesto que las HSP juegan un papel muy importante en la relación que guardan los parásitos con sus huéspedes (Polla BS. 1991). En el caso de *E. histolytica* hay momentos en los que la expresión, o su incremento, de ciertas HSP pudieran ser de importancia para su sobrevivencia, por ejemplo, en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento.

La representación del gene EHHSP70\_1.3kb en el genoma de la amiba se definió como unicopia de acuerdo a los resultados descritos en la Fig. 11. Estos experimentos muestran la presencia de 3 o 4 genes aparte de EHHSP70A y EHHSP70\_1.3KB que podrían corresponder al gene de BiP y algunas de las secuencias descritas parcialmente por Ortner et al. (1992). En todo caso los resultados de tipo Southern de Ortner et al son muy poco resolutivos

por encima de 2kb por lo que el patrón de restricción que encontramos en el DNA de la cepa HK9 no es comparable al de la cepa SFL-3 utilizada por ellos.

En todos los organismos investigados, el choque térmico resulta en una inmediata activación transcripcional de los genes "heat shock" y en muchos, una preferencia traduccional de los mensajeros correspondientes. El choque térmico también afecta otros aspectos del metabolismo de RNA incluyendo el procesamiento de los transcritos primarios de RNA y degradación de RNAm. Estos eventos han sido descritos detalladamente para *Drosophila*, pero muchos de estos fenómenos pueden ser universales entre los eucariotes (Osteryoung WK et al. 1993; Yost H et al. 1990). La represión y degradación de RNAm-HSP70 es un proceso altamente regulado y aparentemente, un mecanismo para la degradación del mensajero de HSP70 que pre-existe a temperaturas normales. Estos procesos se encuentran operados por la región 3'-no codificante o 3'-UTR (Yost H et al. 1990; Dellavalle RP. et al. 1994).

Es probable que alguna de las clonas cortas en su extremo correspondiente al amino terminal, descritas por Ortner et al. (1992), seguramente corresponda a la clona EHHSP70\_1.3KB que por el momento tiene un tamaño putativo de 0.8-1.3kb por el tamaño del transcrito a temperaturas normales detectado en el "Northern blot" (Figura 13). La variación en el tamaño del transcrito tiene varias respuestas especulativas que debéran ser investigadas posteriormente. Es conocido que la regulación de los transcritos de HSP70 a temperaturas normales es compleja y posiblemente estamos detectando productos intermedios desde transcritos con parte de la secuencia de 3'-UTR, como se ha encontrado en otros casos (Calderwood S. y Clayton H.1990; Berger BL y Meselson M. 1993), hasta transcritos que son parcialmente degradados (Dellavalle RP. et al 1994; Osteryoung WK et al



1993), pasando por las formas poliadeniladas correctas.

De esta forma, la futura obtención de la secuencia de la región 3'-terminal del gene EHHSP70\_1.3KB y ensayos de expresión bajo diferentes condiciones de estrés con sondas localizadas dentro y fuera de la región 3'-codificante serán básicos para profundizar en el conocimiento de la regulación de la transcripción y modificaciones post-transcripcional de este gene.

# CONCLUSIONES

De la clona de 4.5kb (EHHSP70\_4.5kb) previamente aislada en el laboratorio a partir de una una librería genómica de *E. histolytica* (HK9), se obtuvo la subclona EHHSP70\_1.3kb la cual contiene secuencia nucleotídica que codifica para la región N-terminal (240 aminoácidos) de una HSP70 putativa.

Esta secuencia corresponde parcialmente al dominio de unión de ATP de las HSP70, con una delección de 111 residuos en relación al extremo N-terminal de la proteína ENHHSP70A reportada por Ortner et al. (1992) en *E. histolytica* (SFL-3).

La secuencia de la región 5' no codificante mostró motivos (con similitud parcial) de reconocimiento de HSF (Pelham HR. 1986; Xiao H. et al. 1988) y una secuencia TATA que se conforma por el consenso descrito en amiba (Bruchhaus M, et al.1992).

El análisis por "primer extension" determinó el sitio de inicio de la transcripción a 104pb del sitio ATG.

El gene EHHSP70\_1.3kb se mostró unicopia en el genoma por ensayos de "Southern blot", mientras que por "Northern blot" se detectaron transcritos heterogéneos con tamaños que van de 0.8 a 1.3

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# BIBLIOGRAFIA

Abernethy RH, Thiel DS, Petersen NS Helm K. 1989. thermotolerancia is developmentally dependent in germinating wheat seeds. *Plant Physiol.* 89:569-79

Allen R., O'Brien D., Eddy E. 1988 A novel hsp70-like (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Mol Cel. Biol.* 8:828-32.

Altschul, S.F. Boguski, MS. Gish-W y Wootton JC 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol.Biol.* 215:403-10.

Ananthan J, Goldberg AL Voelmy R 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232:522-24

Aatsinki JT; Lakkakorpi JT; Pietila EM y Rajaniemi HJ. 1994 A coupled-step reverse transcription PCR procedure for generation full-length oprn readin frames. *Biotechniques* 16(2) 282-288.

Ausubel, FM. et al 1992. Short Protocols in Molecular Biology 2ª ed .Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.

Barrios, C., Lussow, A.R., Van Embdem, J., Van der Zee, R., Rappuoli, R., Costantino P., Louis, J. A., Lambert, P.-H. y Del Giudice, G. 1992 Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. II: the use of the 70 kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for confugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guérin priming *Eur. J. Immunol* 22:1365-1372.

Berger BL y Meselson M 1993. Production and cleavage of *Drosophila* hsp70 transcripts exteding beyond the polyadenylation site. *Nucleic Acids Research* . 22(15):3218-3225.

Bruchhaus M. Leippe, C. Lioutas y Tannich E. 1993. Unusual gene organization in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *DNA Cell Biol.* 12(10):925-933.

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assenbly. *Scince* 248:850-54.

Calderwood S. y Clayton H.1990. Production and cleavage of *Drosophila* hsp70 transcripts extending beyond the poliadenilation site. *Nucl. Acid Res* 22(15):3218-3225

Bird P. Gething M-J, Sambrook J. 1987. Translocation in yeast and mamalian cells: not all signal sequences are functional equivalent *J. Cell. Biol* 105:2905-14

Boon-Niermeijer EK. 1991. Effect in snail development. *Results Probl. Cell. Differ* 17:7-28

- Bork P; Sander C; Valencia A 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:16:7290-4
- Craig E., Junk, P. y Boorstein, W. 1990 A review of the role of 70kDa heat shock protein translocation across membranes. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 137-146.
- Craig E. y Jacobsen K. 1984. Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell* 38:841-49
- Craig E, Jacobsen K. 1985. Mutations in cognate genes of *Sacharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol. Cell Biol* 5:3517-24
- Dellavalle, R. P. Petersen R. y Lindquist S. 1994 Preferential deadenylation of Hsp70 mRNA plays a key role in regulating Hsp70 expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 14: 3646-3659
- Diamond, LS. (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. histolytica*-like amebae. *J Parasitol.* 54, 1047-1056.
- DeNagel DC. y Pierce S. 1993. Heat shock in immune response. *Critical Reviews Immunol* 13(1):71-81.
- Dura JM, 1981 Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet* 184:381-85
- Finely D, Ozkaynak E, Varshavsky A. 1987. the yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and others stress.
- Flaherty MK, Flaherty C-D y McKay BD 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 236 623-628.
- Flaherty MK, McKay BD, Kabsch W y Holmes K. 1991 Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein *Proc Natl Acad Sci* 88:5041-5045
- Flynn GC, Pohlj Flocco MT, Rotman JE; 1991. Peptide binding especificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353:726-30
- Folz KR, Partin JS Lennarz WJ 1993. Sea urchin egg receptor for sperm: sequence similarity of binding domain and hsp70. *Science* 259:1421-25

Gaut, RJ y Hendershot LM 1993. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. *J. Biol. Chem* 268 10:7248-7255.

Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.

Gish, W. y Stataes J. 1993. Information of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3:266-72.

Glass, DJ., Polvere, R. y Van der Ploeg LHT. 1986. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 6:4657-4666.

Goldber AL 1972 Degration of abnormal proteins in *E.scherichia coli*. *Proc Natl Nac Sci* 69:422-26

Gupta RS, Singh B. 1992. Cloning of the HSP70 gene from *Halobacterium marismortui* relatedness of archebacterial HSP70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the HSP70 gene. *J.Bacteriol.* 174: 4594-605

Gwo-Sho L.M. Atkinson BL. Gianniniy Van der Ploeg Lex H.T. 1990 Estructure and expresion of the hsp70 gene family of *Leismania major*: Nucl. Acid. Res

Gwo-Sho L.M. y Van der Ploeg Lex H.T. 1990 Transcription of heat shock 70 locus in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41 221-232.

Heikkila JJ. Kloc M. Bury J. Schultz GA. Browder LW. 1985. Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of *Xenopus laevis*.

Hunt, C y Calderwood, S 1990. Characterization and sequence of a mouse hsp70 gene and its expression in mouse cell lines. *Gene* . 87 :199-204.

Johnson HD. 1992 PCR amplification of microdissected DNA. In PCR A Practical Approach. By McPherson MJ, Quirke y Taylos GR. IRL Press.

Kafatos, CF., Jones CW. y Efstratiadis A.1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. 7(6):1541-1552.

Kaufmann SHE. 1990 Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today* 11(4) 129-136.

Katiyar SK. Visvesvara G. Edlind T. 1995. Comparasions of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing mRNA binding and paromomycin susceptibility. *GENE* 152:27-33.

Klemenz R, Hultmark D, Gehring WJ. 1985. Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster*. depends on sequence information in the leader *EMBOJ.* 4:2053-60

Landry J, Chretien p, Lambert H, Hickey E, Weber LA 1989. heat-shock resistance conferred by expresion of the human HSP27 in rodents cells. *J. Cell Biol* 109:7-15.

Li GC, Li LG, Liu YK, Mak JY, Chen LL et al 1991. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblast. *Proc Natl Acad Sci.* 79:3218-22

Li, CG; Li L; Liu RY; Rehman M y Lee MW 1992 Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletions of its ATP-binding domain. *Proc Natl Acad Sci* 89:2036-2040.

Lindquist S. 1980. Translational efficiency of heat-induced messages in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 137:151-58.

Lindquist S. 1986 The heat shock response *Ann. Rev. Biochem* 55, 1151-1191

Lindquist S. y Craig E.A. 1988. The heat-shock proteins *Annu Rev Genet.* 22:631-677

Lindquist S. y Petersen R. 1990 Selective translation and degradation of heat-shock messenger RNAs in *Drosophila*. *Enzyme* 44: 147-166

Lindquist S. 1992 Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2:748-55

Lindquist S, Parsell DA, Sanchez Y, Taulien J, Craig EA et al. 1993 Heat shock proteins in stress tolerance. *J. UOEH* 15: 1-9

Lopez, MC., Requena JM., Vegara, R. Martín F. y Alonso, C. 1993: Proteínas inducibles por choque térmico en parásitos. *Parasitología Molecular*, Ed. Rivas LL y Lopez MC, Consejo superior de investigaciones científicas de España Madrid. pp145-160.

Martínez-Palomo A.. 1982. The biology of *Entamoeba histolytica*. Wiley . Chichester

Martínez-Palomo A 1987. Las amibas. Enemigos invisibles. Fondo de Cultura Economica México

Martin F., Requena J.M. Martin J. Alonso C. López M.C. 1993. Cytoplasmic-nuclear translocation of the hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 1963:1155-1162.



Marresca B. y Carratú L. 1992 The biology of the heat sock response in parasites. *Parasitol Today* 8, 260-266

Mason P.J., Shiel, B.R. Andrew, T. Beck, P. y hall, R. 1989 Sequence and expresion of a gene from *Theileria annula* coding for a 70-kilodalton heat-sock protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37 27-36.

McGarry TJ, Lindquist S. , 1995 the preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader *Cell* 42:903-11

Milarski KL y Morimoto R. 1989 Mutational analysis of the human HSP70 protein: Distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *The J. Cell. Biol.* 109:1947-1962

Muller WU, Li GC, Goldstein LS 1985 Heat does not inducce syntesis of heat-shock proteins or thermotolerance in the earliest stage of mouse embryo development. *Int. J. Hyperthermia*

Munro S. Pelham HR. 1986 An Hsp70-like protein in the ER; identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291-300.

Nelson RJ. Ziegelhoffer T, Nocolet C Werner-Washburne M. Craig EA. 1992. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein syntesis. *Cell*. 71:97-105

Newport, G. Culpepper J. y Agabian, N. 1988. Parasite heat shock proteins. *Today* 4:306-312..

Ortner S. Plaimauer B. Bindr M. Wiedermann G. Scheiner O. y Duchène 1992. Humoral immune response against a 70-kilodalton heat shock protein of *Entamoeba histolytica* in a group of patients with invasive amoebiasis. *Molecular and Biochemical Parasitol* 54:175-184.

Osteryoung WK. Sundberg H y Vierling E. 1993. Poly(A) tail length of a heat shock protein RNA is increased by severe heat stress, but intron splicing is unaffected. *Mol Gen Genet*. 239:323-333.

Parsell DA, y Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet* 27: 437-496

Palleros DR, Reid KL, Shi L, Welch WJ, Fink AL 1993. ATP-induced protein-hsp70 complex dissociation requires K<sup>+</sup> y not involve ATP hydrolysis. Analogy to G proteins. *Nature* 365:664-

Parsell DA, Sauter RT. 1989 Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev* 3:1226-86.

Pelham HR y Bienz M. 1982. DNA sequences required for transcriptional regulation of the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene in monkey cells and *Xenopus* oocytes. In Heat shock. From Bacteria to man. Cold Spring Harbor Lab. p43-48

Pelham HR (1985) Activation of heat-shock genes in eucaryotes. *Trends Genet* 1:31-35

Pelham HR. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46:959-61.

Petersen R, Linquist S 1988. The *Drosophila* hsp70 message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene* 72:161-68.

Pine MJ. 1967 Response of intracellular proteolysis to maturation of bacterial protein and the implications in metabolic regulation *J. Bacteriol.* 93:1527-33.

Plesset J, Ludwig JR, Cox BS, McLaughlin CS 1987 Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* 169:779-84.

Polla BS. 1991 Heat shock proteins in host parasite interactions *Immunol. Today* 12, A38-A41

Raymond-Denise, A., Sansonetti, P.J. and Guillen, N. 1993. Identification and characterization of a myosin heavy chain gene mhcA from the human parasitic pathogen *Entamoeba histolytica* *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 123-131.

Requena JM, López MC, Jimenez-Ruiz A, Moreles G y Alonso, C 1989. Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of *Tripanozoma cruzi*. *Nucl. Acids Res.* 16:1393-1406.

Rothman JE, Schmid SL. 1986. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46:5-9.

Said-Fernández, S, Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza J, Mata-Cardenas B, Navarro-Montejo, L, Garza-Lozano G y Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 82:249-253.

Sanchez Y, Lindquist S 1990 HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248:1112-15.x

Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S, et al. 1992 Hsp 104 is required for tolerance to many forms of stress *EMBO J.* 11:2357-64.

Schroeder H, Langer T, Hart FU, Bukau B 1993. DnaK, DnaJ, GrpE form a cellular chaperone machine capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12;(11)4137-44

Sconzo G, Roccheri MC, La RM, Oliva D, Abrignani A, et al 1986 Acquisition of thermotolerance in sea urchin embryos correlates with the synthesis and age of the heat shock proteins *Cell Differ* 19:173-77.

Seaton BL, Vickery LE 1994. A gene encoding a new Dna/heat homolog in *Escherichia coli*. *Proc Natl. Acad Sci* 91:2066-2070.

Skowrya D, Georgopoulos C, Zyllicz M 1990. The *E coli dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated rna polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62:939-944.

Solomon JM, Rossi JM, Golic K, McGarry T, Linquist S. 1991. Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *New Biol* 3:1106-20

Stuart RA, Cyr DM, Craig E, Neupert 1994. Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *TIBS* 19:87-92.

Subjeck JR, Shyy TT. 1986. Stress protein systems of mammalian cells *Am. J. Physiol.* 250: C1-17.

Trent JD, Osipiuk J, Pinkau T 1990. Acquired thermotolerance and heat shock in the extremely thermophilic archaebacterium *Sulfolobus sp* strain B12. *J. Bacteriol.* 172:1478-84

Welch WJ. 1993. How cells respond to stress. *Scientific American* 268(5):34-41

Xiao H, Lis TJ. 1988 Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Nature* 239:1139-1142.

Yost HJ, Lindquist S. 1986. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis *Cell*, 45:185-93.

Yost H, Petersen RB, Linquist S. 1990. RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response *Trends in Genetics*, 6(7) :223-227.

Zimarino V, Wu C 1987. Induction of sequence-specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without protein synthesis. *Nature* 327:727-30.

Zurita M. Alagón A, Vargas-Villarreal J. y Lizardi, PM 1991. The *Entamoeba histolytica* rDNA episome: nuclear localization, DNase I sensitive map, and espezific DNA-protein interactions. *Molec. Microbiol* 5(8):1843-1851.