

11281
11
20)

CLONACION Y SECUENCIACION

DE GENES DE

Entamoeba histolytica

tesis que presenta

Octavio Manuel Robinson Navarro
para obtener el grado de **Dr. en Ciencias Biomédicas**
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1996
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Esta tesis fue dirigida por el Dr. Ruy Pérez-Montfort, y se realizó en Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Durante el desarrollo del trabajo estuvieron en el Comité de Tesis:

El Dr. Mario Calcagno Montans
El Dr. Ruy Pérez Tamayo
La Dra. Cecilia Ximénez García

Todos ellos miembros de la Facultad de Medicina, UNAM a quienes agradezco el esfuerzo realizado para asesorarme a lo largo del proyecto.

RECONOCIMIENTOS

En la actualidad la labor de investigación difícilmente se concibe como una actividad aislada, es la razón por la cual, cada día es más frecuente encontrar en la literatura trabajos de investigación realizados por múltiples personas, cada uno con distintas habilidades en el quehacer académico. Este comportamiento, de agruparse en las personas que se dedican a la investigación ha sido muy positivo, ya que definitivamente viene a nutrir la formación y la información de todos los miembros y por otro lado agiliza el trabajo del laboratorio. En lo que a mí respecta, deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron y en especial a:

El Dr. Ruy Pérez-Montfort, que amablemente puso a mi disposición su laboratorio y el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto y sobre todo su entusiasmo por acompañarme en esta aventura de incursionar en un campo novedoso y muy competido como es la Biología Molecular.

La Biol. Nallely Cabrera, que siempre hizo gala de buen humor y paciencia al brindarme apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio

El Dr. Roberto Coria, que nos auxilió en la elección de reactivos y equipos al inicio del trabajo y nos ayudó en los primeros pinitos de obtención de ARN mensajero y posteriormente en el análisis de las secuencias de algunas clonas.

El Dr. Abraham Landa, que abrió un espacio en su saturada agenda para ayudarme a amplificar algunos insertos de ADNc de *Entamoeba histolytica*.

El Dr. Pedro Ostoa Saloma, que siempre se mostró dispuesto a compartir conmigo su experiencia en el manejo de las proteinasas de *E. histolytica* y me obsequió los anticuerpos con los que realizamos el tamizaje inicial de la Biblioteca de ADNc.

El Sr. Jorge Ramírez, quien tuvo la gentileza de ayudarme en la preparación de parte del material fotográfico y proporcionarme las primeras lecciones de fotografía.

La M. en C. Emma Saavedra Lira, que compartió conmigo algunos de los secretos del Southern blot y con quien tuve que realizar una agresiva labor de convencimiento para llevarla al laboratorio del Dr. Pérez-Montfort y motivarla para que continuara con la secuenciación de las clonas aisladas.

A todos ellos muchas gracias.

Finalmente, con este trabajo quiero rendir un humilde homenaje a una gran persona que siempre estuvo dispuesta a escuchar mis preocupaciones y dudas, durante mi estancia en el Departamento de Microbiología, del IFC, la Dra. Aurora Brunner.

| | |
|---|------|
| INDICE. | v |
| RECONOCIMIENTOS | ii |
| ABREVIATURAS. | viii |
| RESUMEN. | x |
| ABSTRACT | xi |
| I. INTRODUCCION. | 1 |
| I.1. Antecedentes históricos. | 1 |
| I.2. Importancia de la amibiasis. | 2 |
| I.3. Ciclo vital. | 3 |
| 1.3.1. Trofozoito. | 3 |
| 1.3.2. Prequiste. | 3 |
| 1.3.3. Quiste. | 3 |
| 1.3.4. Metaquiste. | 4 |
| 1.3.5. Trofozoito metaquístico. | 4 |
| I.4. ADN de <i>Entamoeba histolytica</i> . | 4 |
| I.5. Características de los ARN. | 8 |
| I.5.1. ARN polimerasas. | 8 |
| I.5.2. ARN nuclear. | 9 |
| I.5.3. ARN ribosomal. | 9 |
| I. 5.4. ARN mensajero. | 10 |
| I.5.5. ARN de transferencia. | 11 |
| I.6. Uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de amibiasis. | 12 |
| I.7. Genes clonados y secuenciados. | 19 |
| I.8. Uso de codones. | 21 |
| II. OBJETIVO. | 24 |
| III. MATERIALES Y METODOS. | 25 |
| III.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> . | 25 |
| III.2. Construcción de una biblioteca de ADN complementario. | 25 |
| III.3. Diseño de una sonda sintética de ADN. | 27 |
| III.4. Marcaje de la sonda sintética de ADN: con biotina y dATP (³² P). | 29 |
| III.5. Producción de anticuerpos antiproteinasa. | 29 |
| III.6. Marcaje de la proteína A con ¹²⁵ I. | 30 |
| III.7. Tamizaje de la biblioteca de ADNc usando anticuerpos. | 30 |
| III.7.1. Selección de clones positivas. | 30 |
| III.8. Hibridación en placa. | 30 |
| III.8.1. Detección de la sonda sintética biotinilada. | 31 |
| III.9. Obtención del ADN del bacteriófago lambda gt 11. | 31 |

| | |
|--|----|
| III.10. Hibridación en punto (dot blot). | 31 |
| III.11. Hibridación directa en gel de agarosa. | 32 |
| III.12. Hibridación tipo Southern. | 32 |
| III.13. Amplificación de insertos de las clonas 7 y 12 por PCR. | 32 |
| III.14. Secuenciación por el método de Sanger. | 32 |
| IV RESULTADOS. | 33 |
| IV.1. Aislamiento de clonas de ADNc de <i>E. histolytica</i> usando anticuerpos. | 33 |
| IV.2. Hibridación en placa de una de las clonas aisladas. | 34 |
| IV.3. Hibridación en punto (dot blot) de ADNc de las clonas seleccionadas por anticuerpos y por la sonda sintética de ADN biotinilada. | 35 |
| IV.4. Hibridación directa en gel de agarosa con una sonda sintética biotinilada. | 36 |
| IV.5. hibridación directa en gel de agarosa con una sonda sintética radiactiva. | 38 |
| IV.6. Southern blot de los ADNs de las clonas seleccionadas con antiproteinasa. | 39 |
| IV.7. Southern blot del ADN de las clonas 7, 9, y 12. | 41 |
| IV.8. Patrones de digestión de las clonas 7 y 12 y de los insertos respectivos. | 44 |
| IV.9. Secuenciación de las clonas. | 48 |
| V. DISCUSION. | 53 |
| VI. CONCLUSIONES. | 57 |
| VII.BIBLIOGRAFIA. | 59 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato |
| NBT | tetrazolio nitroazul |
| A | adenina |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ácido desoxirribonucleico complementario |
| ADNr | ácido desoxirribonucleico ribosomal |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ARNr | ácido ribonucleico ribosomal |
| ARNt | ácido ribonucleico de transferencia |
| ARS | secuencia de replicación autónoma |
| bp | pares de bases |
| BSA | albúmina sérica bovina |
| C | citosa |
| CLA | clona seleccionada con anticuerpos |
| CLP | clona seleccionada con sonda |
| dATP | desoxiadenosina-5'-trifosfato |
| dCTP | desoxicitidina-5'-trifosfato |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| dGTP | desoxiguanosina-5'-trifosfato |
| DNAasa | desoxirribonucleasa I |
| dTTP | desoxitimidina-5'-trifosfato |
| EDTA | etilediaminotetraacetato |
| G | guanina |
| HMG | grupo de proteínas de alta movilidad |
| IPTG | isopropiltiogalactósido |
| ITS | espaciador interno transcrito |
| kb | kilobases |
| lsu | subunidad mayor ribosomal |
| NFDM | leche en polvo descremada |
| NP | no patógena |
| nt | nucleótidos |
| oligo(dT) | oligo(dT)celulosa |
| P | patógena |
| PBS | amortiguador de salina fosfato |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PEG | polietilenglicol |

| | |
|-------|---|
| PSB | amortiguador para resuspender fagos |
| RFLP | fragmento de restricción polimórfico |
| SA-AP | estreptavidina-fosfatasa alcalina |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SM | medio de suspensión |
| SSC | amortiguador de citrato/solución salina |
| ssu | subunidad menor ribosomal |
| T | timina |
| TBE | tris-borato-edta |
| TE | tris/edta |
| U | uracilo |

RESUMEN

La amibiasis es un padecimiento que afecta al 12 % de la población mundial, presentándose con distinta severidad de un paciente a otro, lo que hizo pensar en la participación de agentes patógenos diferentes, que si bien pertenecían al mismo género y especie, eran cepas que mostraban un comportamiento diferente en relación a su patogenicidad y virulencia. Los estudios realizados a la fecha han permitido clasificar a *Entamoeba histolytica* como "patógena" y como "no patógena", en función de sus patrones enzimáticos. Actualmente a la cepa no patógena se le designa como *Entamoeba dispar*. Sin embargo, se presentó una gran controversia en relación a esta clasificación, ya que un grupo de investigación presentó resultados que apuntaban hacia la conversión de *E. dispar* a *E. histolytica* dependiendo de las condiciones del microambiente que rodeaban a este parásito. Los estudios de la organización genética de este organismo, a través de técnicas de biología molecular, permitieron aislar genes que codificaban para ARNr, que por la naturaleza de su función se convirtieron en herramientas muy importantes no solo para realizar estudios evolutivos y buscar las relaciones filogenéticas entre especies, sino que también permitieron generar metodología diagnóstica más específica, y que vino a esclarecer la ambigüedad comentada anteriormente. En este trabajo presentamos datos acerca del 60.3 % de la secuencia del ARNr 18S de la subunidad menor de los ribosomas de *E. histolytica* HM1: IMSS, que es una cepa aislada en nuestro País y que ha sido utilizada mundialmente como control de patogenicidad en diferentes estudios de amibiasis. Por otro lado también presentamos la secuencia parcial de un gene que codifica para la enzima piruvato, ortofosfato dicinasa, que es una enzima central en el metabolismo de carbohidratos de este organismo. Estos genes podrían ayudar en el futuro a generar nuevas herramientas de interés no solo en el diagnóstico, sino también de nuevas estrategias terapéuticas.

ABSTRACT

Amebiasis is an illness that affects 12 % of the world population. The infection can range from mild asymptomatic to severe dysenteric disease. This difference in behavior suggested the presence of different pathogenic agents, perhaps belonging to different species. Current research considering isoenzymatic patterns (zymodemes) permits the classification of *Entamoeba histolytica* into "pathogenic" and "non pathogenic" strains. However this classification began a great controversy because a few research groups obtained results that showed conversion of a "non pathogenic" strain into a "pathogenic" strain, by varying the micro-environment around of the parasites. Recent studies of genetic organization of *E. histolytica* using molecular biology techniques have found differences at the nucleic acid level between "pathogenic" and "non pathogenic" strains. These results suggest that there are indeed two species and "non pathogenic" *E. histolytica* has been renamed *E. dispar*. Some of the genes that show differences are the genes encoding rRNA. These molecules have become important tools for investigation of phylogenetic relationships between species and in development of diagnostic methods. Here, we show results that include about the 60.3 % of the sequence of 18S rRNA of the small subunit of the ribosomes of *E. histolytica* HM1: IMSS. This strain was isolated in Mexico have been used all over the world as a standard for pathogenic behavior in amebiasis studies. We also show a partial sequence of the gene encoding the pyruvate, orthophosphate dikinase, an enzyme that plays a central role in the carbohydrate metabolism of this parasite. In the future, these genes could generate new interesting tools for diagnostic methodology and modern therapeutic strategies.

I. INTRODUCCION

La amibiasis es una enfermedad infecciosa (endémica) en países subdesarrollados, que no cuentan con educación ni con servicios públicos de drenaje y alcantarillado. El agente etiológico de este padecimiento es el protozooario *Entamoeba histolytica*. Su ciclo vital incluye dos fases: el trofozoito y el quiste. Este último es considerado la forma infecciosa.

Existen muchas revisiones sobre diversos aspectos de la biología y biomedicina de *Entamoeba histolytica* (Albach, R. A., 1989; Bruckner, D. A., 1992; Petri, W. A. Jr., 1990; Reed, S. L., 1992; Horstmann, R. D. et. al., 1992; Walsh, J., 1986). En esta primera parte el trabajo se enfocará a revisar algunos antecedentes históricos, la importancia de la amibiasis como problema de salud pública y la biología celular de *E. histolytica*, profundizando en los conocimientos actuales de su material genético, alguna metodología para estudiar el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) y la utilización de esta información con fines diagnósticos.

I.1 Antecedentes históricos.

La primera descripción de *Entamoeba histolytica* la realizó Lösh en 1875 al analizar la materia fecal de pacientes que tenían disentería crónica en San Petersburgo, Rusia y observar la forma de trofozoito. Originalmente la denominó *Ameba coli*, y para demostrar que efectivamente se trataba del agente causal del padecimiento, reprodujo los postulados de Koch al alimentar un perro con heces infectadas. Aun sin embargo no logró mimetizar el cuadro clínico que se presenta en humanos (Bruckner, 1992). La observación de la forma quística de *E. histolytica* la efectuaron Quincke and Roos en 1893. La descripción de las evidencias clínicas y patológicas entre la asociación de *E. histolytica* con la disentería y el absceso hepático la hicieron Councilman and LaFleur en 1895. Schaudinn le acuñó el nombre de *Entamoeba histolytica* en 1903 y la diferenció de *Entamoeba coli* (Kean, et. al., 1978).

Probablemente los primeros experimentos controlados usando como agente infeccioso a *E. histolytica* los realizaron en las Filipinas. Cuando se inocularon prisioneros se hicieron las siguientes observaciones: 1. La infección ocurría por quistes, no por trofozoitos. 2. Los portadores asintomáticos eran probablemente los reservorios y los responsables de la transmisión. 3. Había diferencias entre los individuos

para sufrir la enfermedad.4. Existían diferencias en la virulencia de las cepas (Walker and Sellards, 1913).

Los primeros en cultivar exitosamente a *E. histolytica*, usando el medio de huevo de Locke fueron Boeck and Drbohlav en 1925. Otros medios usados para cultivar cepas patógenas fueron reportados posteriormente (Balamuth, 1946; Jones, 1946; Robinson, 1968). Sin embargo, el primer cultivo axénico lo logró Diamond en 1961.

I.2 Importancia de la amibiasis

Guerrant en 1986 estimó que el 12 % de la población mundial estaba infectada por *E. histolytica* y que la mortalidad anual era de 40,000 a 110,000 personas. La prevalencia de la infección difería de una región a otra, así como la severidad de la enfermedad de un paciente a otro. Estas diferencias en prevalencia a menudo dependían de los métodos de detección usados y del número de muestras de materia fecal analizadas. Walsh en 1986 encontró que alrededor del 10 % de las personas infectadas cada año mostraban síntomas clínicos. De los 48 millones de personas con síntomas clínicos, del 80 al 90 % tenían síntomas relacionados con la mucosa intestinal ; y solo del 2 al 20 % de la población con síntomas clínicos presentaban lesiones diferentes a la de la mucosa intestinal. Por otro lado es poco frecuente encontrar evidencias de recurrencia de colitis invasiva o absceso amibiano. de León en 1970 monitoreó más de 1000 pacientes con absceso hepático amibiano por 5 años y encontró una recurrencia de 0.29 %.

Se observó que la principal vía de contaminación eran la ingesta de alimentos y agua contaminados con quistes de *E. histolytica* provenientes de heces humanas. La transmisión de *E. histolytica* por agua es común en ciudades de países pobres donde el agua no es tratada y utilizan a la materia fecal como fertilizante (Markell, et. al., 1986)

Se encontró que la amibiasis sólo es producida por los quistes y que su viabilidad de aproximadamente 3 meses podía ser modificada por las condiciones ambientales. Los quistes viables en agua pueden ser destruidos por clorinación o iodinación (Kahn and Visscher, 1975).

Los grupos de alto riesgo reconocidos incluyen a viajeros, inmigrantes, trabajadores migrantes, individuos inmunocomprometidos, enfermos de instituciones mentales y hombres homosexuales activos (Allason-Jones, et. al., 1986).

I.3 Ciclo vital

El ciclo vital de *E. histolytica* en humanos no se conoce completo hasta la fecha. describiéndose solo dos fases: trofozoito y quiste. Los estudios que existen corresponden al ciclo de una cepa de *E. histolytica* aislada de un mono (*Macaca sinicus*) que incluyen las fases de: trofozoito, prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito metaquístico, (Dobell, C., 1928).

I.3.1 Trofozoito

El tamaño de los trofozoitos varía de 12 a 60 μm de diámetro, con formas más grandes en tejidos y formas más pequeñas en portadores asintomáticos (Guerrant, 1986). Las formas más grandes en tejidos podrían ser el resultado de una actividad celular incrementada, como se observó con el aumento de ADN y ARN (Mackenstedt, *et. al.*, 1990). El trofozoito puede poseer uno o varios núcleos y carece de organelos tales como mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y un citoesqueleto bien definido.

I.3.2 Prequiste

En esta etapa. el trofozoito se convierte al mismo tamaño del quiste aproximadamente, se eliminan los restos de inclusiones alimenticias, se observan depósitos difusos de glucógeno y cuerpos cromatoides ocasionales. El cuerpo cromatoide está compuesto de ribosomas, pero su papel funcional es desconocido (Markell, E. K., 1986). La forma prequística es uninucleada y el núcleo alargado contiene un cariosoma que es más o menos excéntrico.

I.3.3 Quiste

La pared quística se desarrolla alrededor de la forma prequística, y el único núcleo se divide para formar ésta fase cuadrinucleada. Generalmente, el gluógeno y el material cromatoide desaparecen conforme madura el quiste. En preparaciones frescas el quiste es de forma redondeada o ligeramente oval y contienen cuatro núcleos. La membrana nuclear está uniformemente remarcada por la cromatina condensada periféricamente. El cariosoma es pequeño y generalmente se localiza en el centro del núcleo. El diámetro de los quistes varía de 8.5 a 19 μm .

1.3.4. Metaquiste

Durante el proceso de transformación del quiste a metaquiste, la amiba enquistada se vuelve muy activa, separándose de la pared quística. La amiba cuadrinucleada escapa de la pared quística a través de un poro pequeño.

1.3.5 Trofozoito metaquístico

Una vez fuera del quiste la amiba se divide para dar lugar a 8 trofozoitos metaquísticos uninucleados. Los trofozoitos resultantes son más pequeños (8 μm) que los observados en el intestino de un humano infectado. El trofozoito metaquístico continúa alimentándose y creciendo hasta alcanzar el tamaño del trofozoito adulto.

I.4 ADN de *Entamoeba histolytica*

Los estudios de microscopía mostraron que *E. histolytica* era un eucarionte primitivo, ya que como se mencionó antes carecía de un citoesqueleto estructurado y microtúbulos citoplasmáticos, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y lisosomas típicos. De hecho el único organelo eucariótico característico era el núcleo (Martínez Palomo, 1982; 1986). Los componentes nucleares de este parásito tenían una distribución diferente de la configuración nuclear usual de células eucarióticas. El material nuclear se observó como una pequeña masa esférica, de alrededor de 0.5 μm de diámetro que se localizaba cerca del centro del nucleoplasma. La denominada cromatina periférica se encontró alrededor de la membrana nuclear y era rica en ARN (Martínez Palomo, 1982; Albach *et al.*, 1980). Se ha propuesto que la cromatina periférica es la contraparte del nucléolo eucariótico (Albach, *et al.*, 1980).

La cromatina en la mayoría de células eucarióticas está organizada en nucleosomas. El nucleosoma es un complejo formado por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 con 160 pares de bases (bp) de ADN enrolladas alrededor del núcleo proteico. La presencia de estas proteínas básicas y su función en la compactación del ADN, podría ser un paso evolutivo importante en la organización del material genómico.

E. histolytica mostró una organización de su material genético en forma de partículas que semejaban la estructura de los nucleosomas. Sin embargo las proteínas básicas que se encontraron asociadas al ADN eran diferentes a las histonas conocidas hasta ahora. Asimismo se observó

que las regiones transcritas activamente eran sensibles a la nucleasa micrococcal (Torres Guerrero, *et. al.*, 1991).

Por otro lado se observó poliploidia, que se evidenció por un núcleo gigante, seguido por segregación de la cromatina en núcleos más pequeños. Estos se generaron por gemación y por producción de policariones de diferente tamaño. La ausencia de citocinesis era la causa de la producción de policariones con una velocidad asincrónica de división celular y nuclear (Byers, 1986; Marquez-Monter, *et.al.*, 1990).

La cantidad de ADN en trofozoitos de *E. histolytica* cultivada axénicamente mostró una gran fluctuación, que se explicó por ligeros cambios en ploidia, heterogeneidad genómica y diferencia en el grado de sincronía de los cultivos (Lopez- Revilla, 1978).

El ADN de *E. histolytica* HM 1: IMSS se encuentra fuertemente asociado a una gran cantidad de carbohidratos que dificultan su purificación. El ADN no digerido migra como una amplia banda entre los marcadores de 6 y 24 kilobases (kb) (Perez-Mutul, *et. al.*, 1986).

En *E. histolytica* como en otros eucariontes los genes que codifican para ARN ribosomal (ARNr) se encuentran altamente repetidos (Long and Dawid, 1980). Se propuso que estas secuencias altamente repetitivas, que muestran un gran polimorfismo evidenciado con enzimas de restricción, podrían ser de utilidad para diferenciar a *E. histolytica* de otras *Entamoebas*. (Bhattacharya, *et. al.*, 1988). Existen reportes que cepas de *E. histolytica* con zimodemos "patógenos" (P) contienen secuencias repetidas de 145 pares de bases (bp), mientras que las amibas que muestran un zimodemo "no patógeno" (NP) es de 133 bp (Garfinkel, *et. al.*, 1989; Samuelson, *et. al.*, 1989). Estas secuencias de ADN altamente repetitivo se localizaron en círculos extracromosomales y se encontró que codificaban para ARNr en *E. histolytica*. Esto parece ser una característica común entre eucariontes inferiores (Bhattacharya, *et. al.*, 1989).

Los análisis de mapas de restricción fueron consistentes con una molécula circular, con un tamaño de 24.6 pares de kb. La digestión con la nucleasa BAL 31 proporcionó evidencia adicional de la naturaleza circular de este ADN. La molécula de ADN ribosomal (ADNr) contenía dos unidades de transcripción organizadas como regiones repetidas invertidas, cada una de por lo menos 5.2 kb de longitud (Huber, *et.al.*, 1989). Una característica interesante de este ADN extracromosómico era la presencia de un fragmento de 802 pares de bases que funcionaba como secuencia de replicación autónoma (ARS) cuando

se insertaba en el ADN de levaduras. Este fragmento contaba con una gran cantidad de AT, tal como las ARS de levaduras (Grodberg, J. *et. al.* 1990). Esta actividad de ARS se localizó en un fragmento de restricción de *Eco* RI de 4.4 kb y se confirmó por su inserción en el plásmido YIP 5 que carecía de ARS (Mittal, V. *et. al.*, 1991). Al efectuar hibridación *in situ*, se observó que existían 200 ó más copias del episoma de ADNr de *E. histolytica*, preferentemente distribuido a lo largo de la cara interna de la membrana nuclear, pareciendo ser parte de la cromatina periférica. Estudios con desoxirribonucleasa (DNAasa I) revelaron una alta sensibilidad en las regiones del episoma que contenían el elemento de 145 bp (Zurita, *et. al.*, 1991), abriendo la posibilidad de que estas fueran regiones que tuvieran capacidad de interaccionar con las proteínas de alta movilidad (HMG), que le podrían conferir cambios específicos en la configuración de la cromatina tal como fue observado en eucariontes (Strauss and Varshavsky, 1984).

Otros estudios mostraron que los patrones de restricción polimórficos (RFLP) del ADNr de *E. histolytica* eran marcadamente diferentes a los observados en otras especies, con muy pocas bandas en común. La digestión de ADN de varias especies de *Entamoeba* con la endonucleasa de restricción *Eco* RI evidenció un número de bandas importantes derivadas de ADN plasmídico ribosomal multicopia. La digestión de ADN de varias clonas de *E. histolytica* HM:1 IMSS con *Eco* RI produjo dos bandas constantes de 2.2 y 5.7 kb que podrían ser utilizados como marcadores específicos de esta cepa. Aun sin embargo otras bandas de de 4.4 y 6.8 kb eran hipervariables y modificaban su tamaño de una clona a otra (Bhattacharya, *et. al.*, 1992; Cazares, F. *et. al.*, 1994).

En casi todos los organismos eucariontes, el gen que codifica para el ARNr 5.8S está ubicado entre dos espaciadores transcritos internos (ITS), los cuales son conservados intra pero no interespecíficamente. En *E. histolytica* y en *E. dispar* el ARNr 5.8S se encontró ubicado en la región comprendida entre los genes 17S y 25S y rodeado por dos ITS. Haciendo un análisis de la secuencia de bases se observó que la mayor parte de las secuencias divergentes estaban localizadas en el ITS2 y que el ADNr 5.8S de *Thermomyces lanuginosus* era el más cercano al de *E. histolytica*, mostrando una identidad de 68.7 % con 99 bp sobrepuestas (Cevallos, *et. al.*, 1993).

Analizando la secuencia nucleotídica de la unidad de transcripción del ARNr de *E. histolytica* HM 1: IMSS se encontró que

está contenida en un fragmento de *Hind* III de 6.3 kb. Se hicieron estudios de Northern blot con subfragmentos de *Eco* RI del fragmento de 6.3 kb para localizar y estimar el tamaño de los genes para el ARNr de la subunidad menor (ssu) y la subunidad mayor (lsu). La longitud inferida del gen ARNr ssu fue de 1946 nucleótidos (nt) y para el ARNr lsu de 3465 nt, ubicándose entre los dos el gen para ARNr 5.8S, flanqueado por dos espaciadores como se muestra Figura 1, (Ramachandran, et. al., 1993).

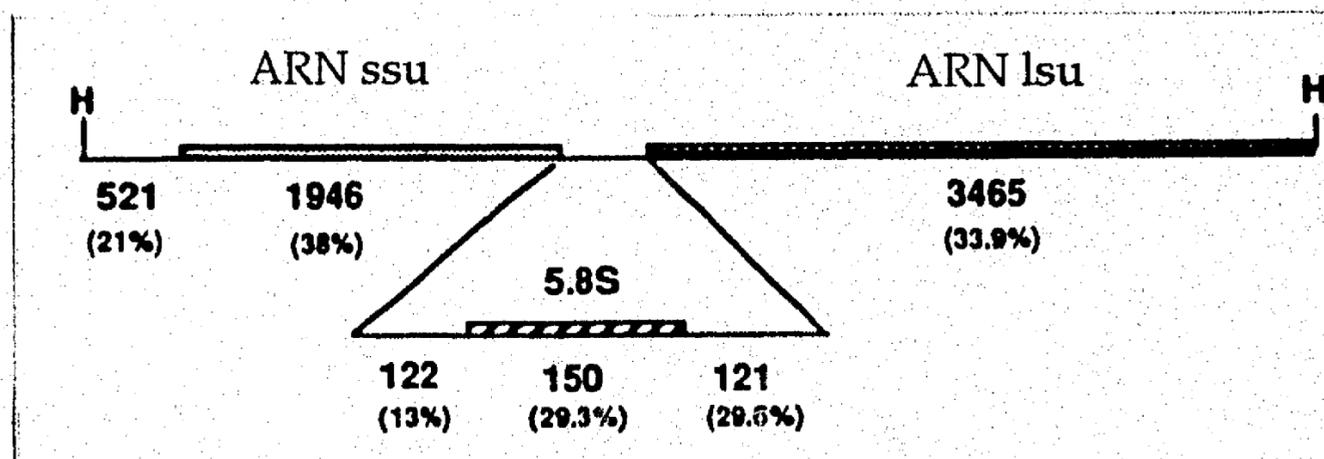


Figura 1. Organización de la unidad de transcripción del ARNr de *E. histolytica*. El número de nucleótidos en cada segmento de la unidad de transcripción está expresado abajo de la línea. Los números dentro de los paréntesis dan el porcentaje contenido de G+C de cada segmento H, *Hind* III (Tomado de Ramachandran, et. al., 1993).

En general las regiones codificadoras mostraron un porcentaje más alto de G+C que las regiones espaciadoras, las cuales tenían un contenido de G+C comparable con los valores reportados para el genoma de *E. histolytica* (22-27%) (Gelderman, et. al.,1971). Comparando la longitud de los espaciadores 1 y 2 de *E. histolytica* con los de otros eucariontes resultaron muy cortos, aunque los ARNr mostraron concordancia con la mayoría de los ARNr de eucariontes. Entre los eucariontes, (incluyendo protozoarios) separados por grandes distancias evolutivas, la longitud de los espaciadores no es la misma, pero son parecidas en el contenido de G+C (Schnare et. al., 1990). En *E. histolytica* se observó una situación diferente, ya que los dos espaciadores eran casi idénticos en longitud, característica presente en unas pocas especies de plantas (Torres, et. al.,1990). Por otro lado los espaciadores variaron importantemente en el contenido de G+C (ITS1 13% e ITS2 29 %), característica que entre eucariontes solo se encontró en *Dictyostelium discoideum*, una especie filogenéticamente muy cercana a *E. histolytica*, (Sogin, et. al 1989).

I.5 Características de los ARN

I.5.1 ARN polimerasas

Para efectuar la síntesis de ARN, se encontró que *E. histolytica* poseía ARN polimerasas que eran dependientes de ADN. Aparentemente estas ARN polimerasas tenían una mayor preferencia por ADN desnaturalizado que por ADN nativo. Usando cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron dos picos que mostraban actividad de polimerasa cuando se usaba como molde un ADN desnaturalizado.

La actividad de ARN polimerasa que eluyó primero de la columna de DEAE-sefadex:

1. Exhibía una actividad óptima en altas concentraciones de sales, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80 mM).
2. Mostraba preferencia por el ADN desnaturalizado sobre ADN nativo como templado.

Esto contrastaba con la mayoría de las ARN polimerasas de eucariontes.

Al analizar la sensibilidad a la alfa-amanitina, utilizando templados de ADN desnaturalizado en los ensayos, se observó que el primer pico exhibía una curva de inhibición bifásica a concentraciones de alfa-amanitina crecientes. Esto sugería que había por lo menos 2 enzimas, una sensible a bajas concentraciones de alfa-amanitina (0.01-

0.03 $\mu\text{g/mL}$), la cual parecía ser comparable a la polimerasa II de otros eucariontes y otra insensible a altas concentraciones (30-100 $\mu\text{g/mL}$), la cual podría ser la polimerasa I y/o una polimerasa III insensible.

El segundo pico eluido mostró una concentración óptima de sales baja, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM) y fue insensible a 100 $\mu\text{g/mL}$ de alfa-amanitina, lo cual la asemejaba a la polimerasa I de la mayoría de los sistemas eucariontes (Vanik, J. *et. al.*, 1980).

I.5.2 ARN nuclear

Estudios citoquímicos iniciales (Pan, C.T., and Geiman, Q. M., 1955) revelaron la presencia de la mayor parte del ADN localizada periféricamente. Estudios autorradiográficos más finos corroboraron la presencia del ARN asociado a la cromatina periférica, el cual podría ser ARNr o bien el precursor de este ácido nucleico (Albach, *et. al.*, 1977; 1980).

I.5.3 ARN ribosomal

Los ribosomas amibianos mostraron un coeficiente de sedimentación de 75S y no se observaron asociados al retículo endoplásmico. Sus subunidades eran de 55S y 35S respectivamente. Estos ribosomas se podían encontrar solos pero la mayor parte del tiempo estaban en arreglos helicoidales en forma de bastón, los cuales eran funcionales en la traducción (Kusamrarn, T., *et. al.*, 1975).

El aislamiento y caracterización del ARNr no fue fácil, ya que se encontró una ribonucleasa asociada íntimamente a los ribosomas y a sus subunidades (Prachayasittikul and Albach, 1982), impidiendo obtener ARN intacto.

Utilizando una técnica que combina dodecilsulfato de sodio (SDS) y dietilpirocarbonato (DEPC) se aisló ARN intacto (Albach, *et. al.*, 1984). Las principales especies de ARN que se obtuvieron por centrifugación en gradiente de sacarosa fueron la de 25S, 17S y 4S. Efectuando electroforesis en gel de poliacrilamida se obtuvo una especie adicional de 5S. Los pesos moleculares determinados en geles de poliacrilamida desnaturalizantes fueron de: 1.31×10^6 (daltones) para 25S, 0.803×10^6 (daltones) para 17S, 4.0×10^4 (daltones) para 5S y 2.5×10^4 (daltones) para 4S. Se observó que el ARN 25S era muy lábil y se disociaba bajo condiciones desnaturalizantes medias (entre 33 y 37 °C) en dos fragmentos 17S y 16S con pesos moleculares de 0.700×10^6 y 0.614×10^6 daltones respectivamente. Estudios posteriores demostraron que

había una alta correlación entre la obtención de ARN 25 S intacto con la edad del cultivo. Se obtenía mayor cantidad de ARN 25S de amibas de cultivos jóvenes (24 h), que de cultivos envejecidos (48-96 h) (Stoner-Picking, *et. al.*, 1986)). Tratando de esclarecer si esta labilidad estaba dada por los procedimientos de extracción de ARN o si se trataba de cortes efectuados durante el procesamiento del ARN en el núcleo, se hicieron estudios de marcado con $U5^3H$ (uracilo tritiado en el carbono 5) por 5 minutos y dos técnicas de extracción diferentes: una que utilizó SDS-DEPC y la otra cloruro de guanidina y posteriormente gradiente en sacarosa.

Monitoreando el perfil de elución a 254 nm, se observaron tres picos de aproximadamente 4S, 17S y 25S. Siguiendo la incorporación de la marca se encontró un perfil heterogéneo. El calentamiento del ARN aislado antes de fraccionarlo, eliminó la mayor parte del ARN de mayor tamaño. Aun así la marca fue evidente a través del gradiente. Esto permitió inferir que la mella del ARNr ocurría en el núcleo y no se trataba de un corte producido por el método de extracción empleado.

El ARN aislado con cloruro de guanidina y marcado por 5 minutos produjo un perfil diferente. La lectura a 254 nm reveló un pico discreto 4S, un pico grande 17S, un pico más pequeño 25S y dos picos muy pequeños 32S y 34S. La marca radiactiva se distribuyó en una amplia banda entre 25-32S. Después de tratar al ARN aislado con calor (55-60 °C), la absorbancia a 254 nm fue más intensa, y permaneció una cantidad pequeña de ARN 25S. También se observó que quedó una pequeña cantidad de ARNr de alto peso molecular antes y después del tratamiento con calor. El perfil heterogéneo de ARN marcado siguió mostrando un pico en 32S. Se propuso que el perfil heterogéneo de marcado rápido podría pertenecer a ARN heterogéneo nuclear como precursor de ARNm y ARNr. Entre el 5 y 10 % del ARN total aislado podría ser ARN poliadenilado (poli-A) ya que fue retenido por oligo(dT)-celulosa (oligo(dT))(Albach, 1989).

I.5.4 ARN mensajero

La información relacionada con las características del ARNm es muy escasa probablemente por la gran cantidad de ribonucleasas presentes no solo dentro de la amiba sino en el medio donde se lleva a cabo el proceso de purificación lo que hace difícil la obtención de cantidades suficientes para su caracterización. Tratando de eliminar esta dificultad se probaron diferentes métodos de

extracción. Los mejores resultados se obtuvieron usando: 1) una técnica que utiliza DEPC (Solimosy, *et. al.*, 1970) modificada, por la adición de altas concentraciones de SDS y en ausencia de Mg^{2+} (Albach, *et. al.*, 1984; Albach, 1989) y 2) un método que utilizó cloruro de guanidina (Mendoza, *et. al.*, 1982). La traducción del ARN obtenido por la técnica que utilizó SDS-DEPC fue ineficiente, debido a que el DEPC reaccionaba con los ácidos nucleicos de una cadena (Ehrenberg, *et. al.*, 1976). También se utilizó isotiocianato de guanidina para aislar ARNm funcional con excelentes resultados (Leyva, *et.al.*, 1986).

1.5.5 ARN de transferencia

Hasta el momento no existe información disponible sobre este tipo de moléculas en *E. histolytica*.

I.6 Uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de amibiasis

Aproximadamente el 90 % de las infecciones con *Entamoeba histolytica* cursan en forma asintomática, lo que siempre induce la discusión acerca de que si los portadores deberán recibir tratamiento o no. Podrían existir dos formas de este microorganismo distinguibles bioquímicamente, que podrían ser explicadas por dos hipótesis:

1. Existían dos especies distintas indistinguibles morfológicamente, una de las cuales causa la enfermedad (Brumpt, 1925).
2. Había una especie que existía en dos formas interconvertibles, una de las cuales era patógena "P".

La primera hipótesis tuvo pocos adeptos hasta que se encontró que las amibas que causaban la enfermedad activa (P) podían ser distinguidas de aquellas encontradas en portadores asintomáticos (NP) por diferencias en sus patrones isoenzimáticos (Sargeant, et al., 1978). Estos datos y otros reportados posteriormente (Strachan, et. al., 1988; Garfinkel, et. al., 1989; Tannich, et. al., 1989) apoyaron fuertemente la hipótesis de las dos especies. Por otro lado se reportaron evidencias de la conversión de patrones isoenzimáticos de cepas "NP" a "P" (Mirelman, et. al., 1986a; Mirelman, et. al., 1986b; Andrews, et. al., 1990), lo cual vendría a apoyar la segunda hipótesis. El conocimiento de cual es la hipótesis correcta tiene grandes implicaciones para la evaluación y tratamiento de los portadores. Tratando de aclarar esta confusión se utilizaron técnicas de biología molecular, ya que hasta la fecha el diagnóstico de infecciones por *E. histolytica* se hace identificando trofozoitos o quistes por microscopia de luz en muestras de materia fecal (Biagi, F. and Portilla, J., 1957).

Una estrategia de interés para resolver esta incógnita fue rastrear las secuencias altamente repetitivas de ARNr (Long and Dawid, 1980). Analizando los patrones de restricción de las secuencias nucleotídicas altamente repetitivas con *Eco* RI se observó que eran suficientemente polimórficas como para distinguir cepas de *E. histolytica* y otras *Entamoebas* (Bhattacharya, et. al., 1988).

Así mismo a partir de una biblioteca genómica de *E. histolytica* se detectaron dos categorías de clonas plasmídicas recombinantes denominadas: pEH2, pEH5, pEH11 y pEH12 y pEH3, pEH4, pEH6 y pEH10. Las primeras cuatro clonas se usaron como sondas para estudios de hibridación de ADN proveniente de los siguientes organismos observados por microscopia en muestras de materia fecal de

pacientes de la Cd. de México: *E. histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia*, *Endolimax nana*, *Trichuris trichura* y *Chilomastix mesnili*. Las cuatro clonas reconocieron ADN de cepas de *E. histolytica* axenizadas y no hibridaron con cepas relacionadas como: *E. histolytica-Laredo*, *E. moshkovskii* o *E. invadens*. Por otro lado no reconocieron ADN de *Giardia* o de bacterias. Aun sin embargo no pudieron distinguir entre *E. histolytica* con zimodemos "P" de aquellas con zimodemos "NP". El otro grupo de clonas (pEH3, pEH4, pEH6 y pEH10) reconocieron secuencias repetidas de ADN las cuales estaban conservadas en todas las especies de *Entamoeba*, por lo cual no fueron de utilidad como sondas para el diagnóstico. Aparentemente estas clonas no específicas correspondían a porciones del gen de ARNr de *E. histolytica*, ya que en estudios de Northern hibridaron con ARN de *E. histolytica*. La secuenciación parcial de la clona pEH6 mostró una homología con el gen de ARNr de la subunidad pequeña de *Dictyostelium discoideum*. Las cuatro clonas de ADN recombinante mostraron patrones de restricción muy semejantes por Southern blot a los exhibidos por ADN de *E. histolytica* cortado con enzimas de restricción (Samuelson, et. al., 1989).

El uso de la información genética presente en los genes que codificaban los ARNr aparte de ser utilizada para estudiar la evolución de las células eucarióticas, también se aprovechó para tratar de distinguir entre cepas "P" y "NP" de *E. histolytica*. A pesar de que los patrones de los fragmentos de ADN de cepas "P" y "NP" son muy similares, algunas enzimas de restricción como: *RsaI*, *XbaI*, *Sau96I*, *DdeI* y *TaqI* revelaron diferencias entre las dos formas, (figura 2). Mapeando estos sitios de restricción variables mostraron que estaban ampliamente dispersos, (figura 3) (Clark and Diamond, 1991). Analizando 18 patrones de "riboimpresión" (riboprinting) de cepas "P" se encontró que todos eran idénticos y distintos de los mostrados por 13 cepas "NP" (Clark and Diamond, 1991a). Tratando de explicar estas diferencias en los sitios de restricción se secuenciaron regiones clonadas de los genes del ARNr de la subunidad menor de 3 cepas "P" y 3 cepas "NP", incluyendo los sitios polimórficos de *RsaI*, *DdeI*, *XbaI*, y *Sau96I*. En la

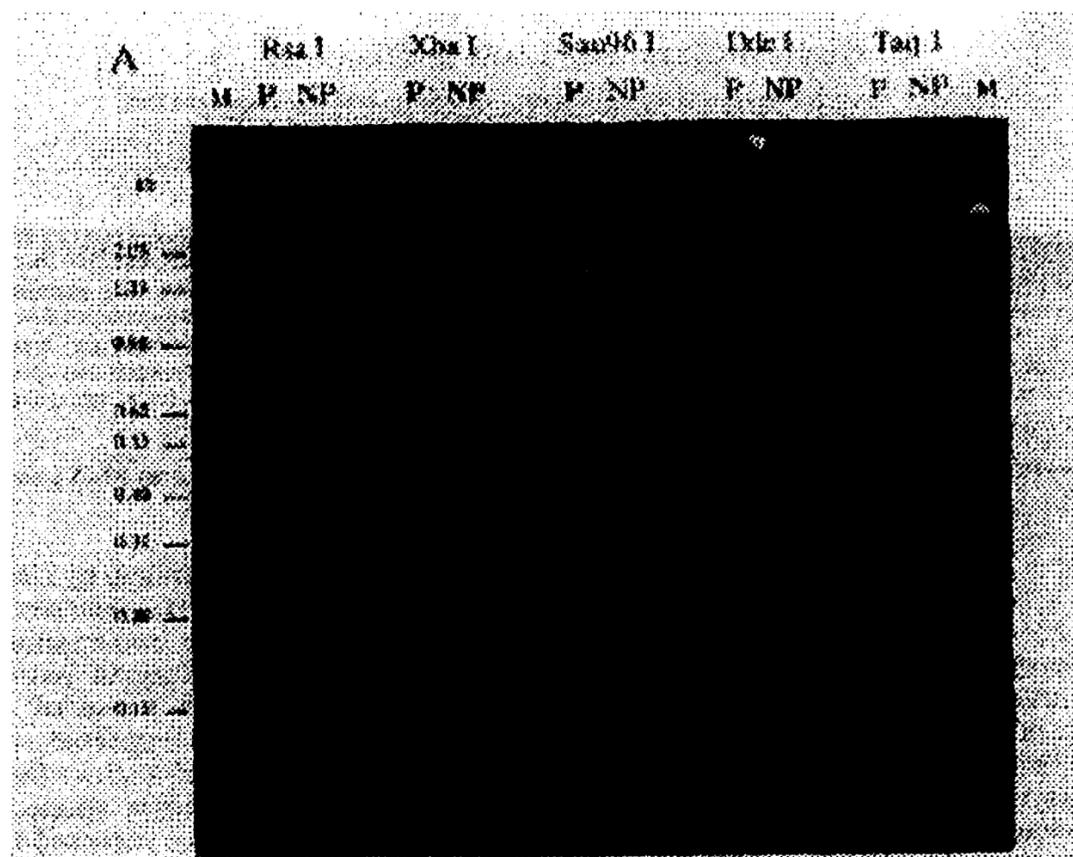


Figura 2. Comparación de las riboimpresiones de cepas "patógenas" y "no patógenas" de *E. histolytica*. El gel teñido con bromuro de etidio ilustra la amplificación por PCR de genes de ARNr de la subunidad menor, digeridos con varias enzimas de restricción, con las cuales pueden ser distinguidas cepas "P" y "NP". Además de las enzimas aquí mostradas, las enzimas *Bgl*II, *Sau*3AI y *Asu*I también fueron capaces de discriminar entre los dos grupos. La cepa "P" usada fue HI-1372:AIIMS. La cepa "NP" SAW760RR cl A. El marcador de peso molecular (M) es una mezcla de ADN de bacteriófago lambda digerido con *Eco*RI + *Hind* III y ADN del plásmido pBR322 digerido con *Msp*I (Tomado de Clark and Diamond, 1991).

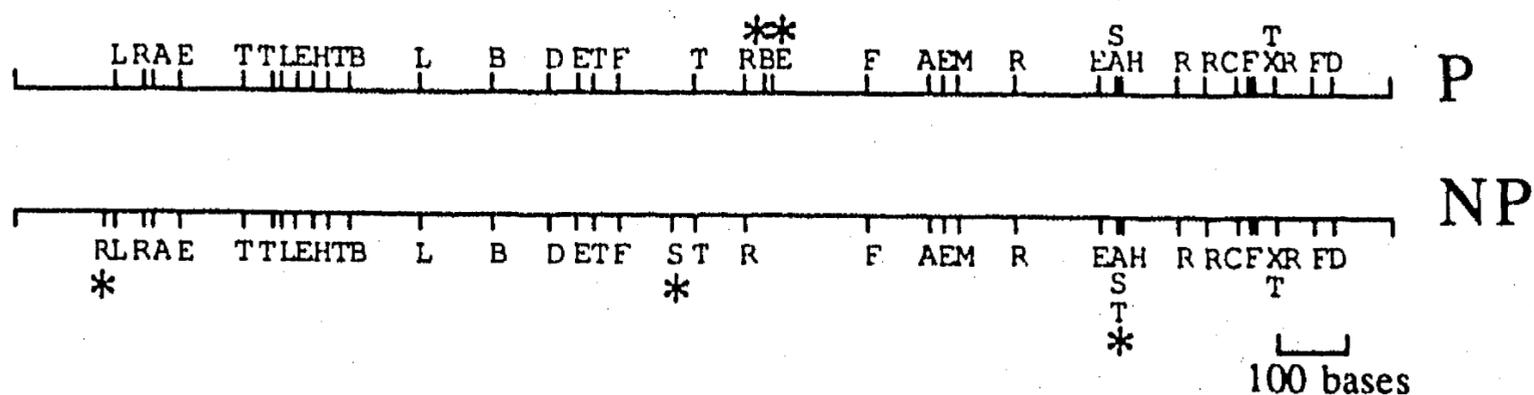


Figura 3. Comparación del mapa de restricción de cepas "P" y "NP". El mapa de restricción del gen de ARNr de la subunidad menor de la cepa "P" fue construido con datos no publicados de la secuencia de *E. histolytica*, amablemente proporcionados por M. L. Sogin. Las riboimpresiones de todas las cepas "P" coinciden exactamente con el tamaño de los fragmentos predecidos por la secuencia. EL mapa de la "NP" fue construido a partir de la incorporación de diferencias en los sitios de restricción y confirmados por doble digestión. Los sitios variables en la figura se señalan con un asterisco. A, *Hae*III; B, *Xba*I; C, *Eco* RI; D, *Dra*I; E, *Dde*I; F, *Hha*I; L, *Alu*I; M, *Msp*I; R, *Rsa*I; S, *Sau*96I; T, *Taq*I; X, *Xho*I (Tomado de Clark and Diamond, 1991).

comparación de 780 bases se encontró que diferían en 17 posiciones (2.2 %), mientras el resto permanecían conservadas. De estas diferencias en secuencias 12 correspondieron con transiciones, 4 transversiones y una inserción/delección. Al analizar las "riboimpresiones" de las cepas de *E. histolytica* que convierten sus zimodemos de "NP" a "P", también se encontraron diferencias (Clark and Diamond, 1991). Esto lo explicaron señalando que los genes de ARNr pertenecían a familias de genes multicopias (Huber, et. al., 1989; Bhattacharya, et. al. 1988) y que podría haber ocurrido una amplificación de un componente menor del ADNr,

durante la conversión de zimodemos (Mirelman, et. al., 1990). Estos cambios fueron localizados en las regiones variables de las secuencias del ARNr de la subunidad menor previamente reportadas (Raué, et. al., 1988).

Tratando de abundar en los argumentos que explicaran si todo el amplio espectro de enfermedades observado en la amibiasis eran causados por la existencia de dos cepas de *E. histolytica*: una "P" y otra "NP", se clonó el gen del ARNr de la subunidad menor (ARNr 16S-like) a partir de una cepa "P" (SD4) y se designó como pEH39. El análisis de la secuencia mostró que tenía una identidad de 65.8 % con el gen de ARNr 18S de *Plasmodium falciparum*, 75.1 % con el gen de ARNr 18S de *Xenopus laevis* y 74.4 % con el gen de ARNr 18S de humano. Para comparar las secuencias de ARNr 16S-like de cepas de *E. histolytica* aisladas de pacientes con enfermedad invasiva (P) y de pacientes asintomáticos (NP), se hicieron análisis de Southern blot de ADN genómico, digerido con *Eco* RI y se hibridaron con el ADNr 16S-like marcado con ATP (32 P en el fosfato alfa). Los patrones de hibridización mostraron claramente las diferencias entre los aislados "P" y "NP", (figura 4) (Que and Reed, 1991).

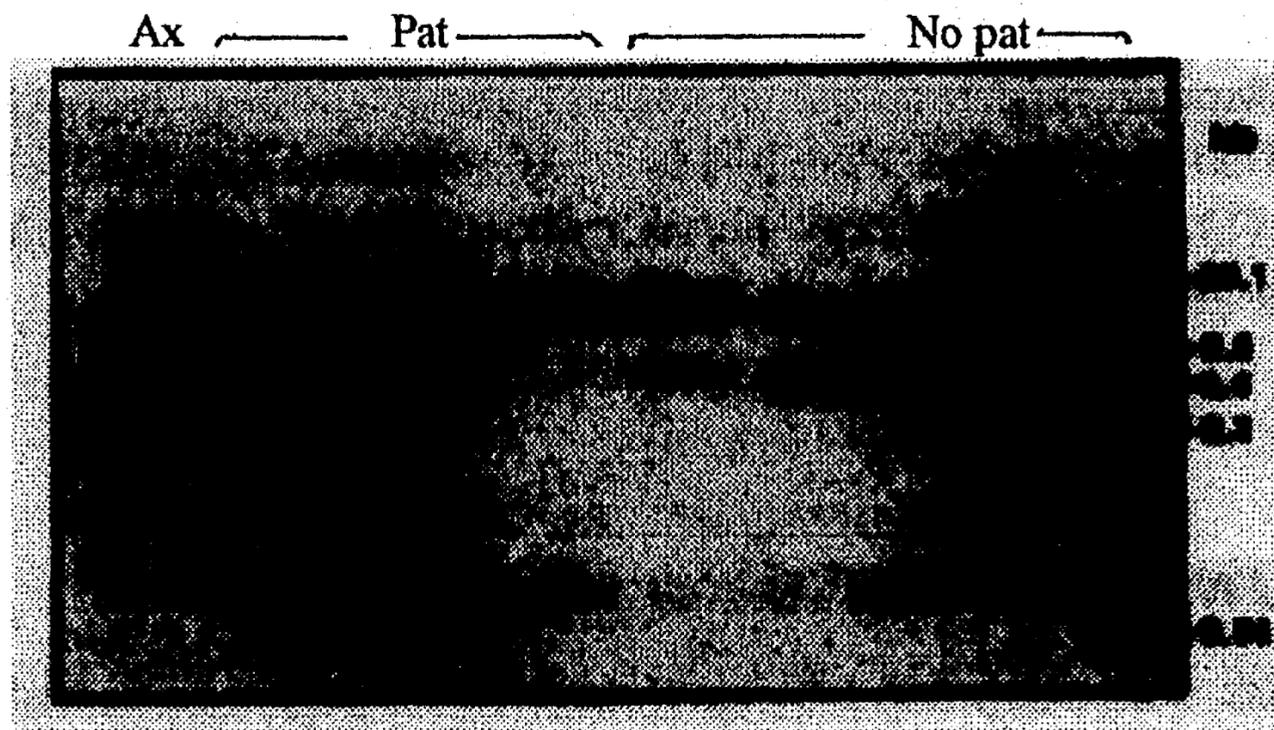


Figura 4. Autorradiografía de un Southern blot de ADN genómico de la cepa axénica HM-1 (Ax), de 3 aislados patógenos (SD136, SD 143 y FAT 957) y de 4 cepas no patógenas (SD 11, SD 107, REF 291 y SAW 1734) digeridos con *Eco* RI y corridos en un gel de agarosa 0.8 %, probados con el fragmento ADNr 16S-like marcado en un extremo (Tomado de Que and Reed, 1991).

Analizando clonas de ADN complementario (ADNc) derivadas de aislados de *E. histolytica* "P" y "NP" (cEh-P1 y cEh-NP1 respectivamente) se detectaron un 10 % de sustituciones en el ácido nucleico, las cuales estaban dispersas a lo largo de la secuencia. Al comparar la secuencia de cEh-P1 y cEh-NP-1 se identificó un fragmento de 482 bp que contenía extremos 5' y 3' idénticos pero que difería en los sitios de rompimiento interno de las endonucleasas de restricción *AccI*, *TaqI* y *XmnI*. Esta diferencia genética se conservó en 4 cepas "P" y en 5 "NP" (Tannich, et. al., 1989). Aprovechando que ambas cepas poseían extremos 5' y 3' idénticos se sintetizaron 2 oligonucleótidos denominados P1-S17 (5'-GCAACTAGTGTTAGTTA) y el otro P1-AS20 (5'-CTCCAAGATATGTTTAAAC). El primero derivado de la hebra con sentido y el segundo de la hebra antisentido de la clona cEh-P1. La amplificación del fragmento de 482 bp y digestión posterior con *XmnI*, *TaqI* y *AccI* permitió diferenciar entre las cepas "P" y las "NP", (figura 5) (Tannich and Burchard, 1991).

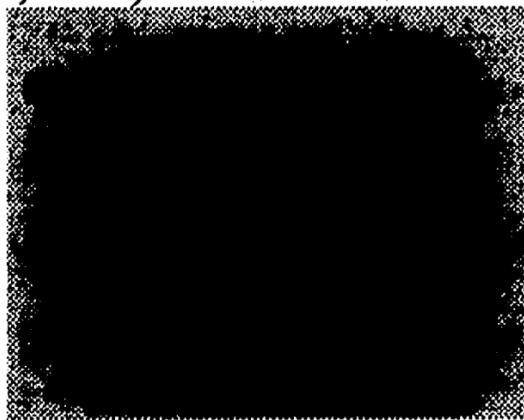


Figura 5. Diferenciación de cepas de *E. histolytica* por PCR y subsecuente análisis de los fragmentos de restricción. Lisados de células completas de la cepa "P" SAW755 y la cepa "NP" SAW760 se sometieron al proceso de amplificación de ADN. Alicuotas del material amplificado se digirieron con las endonucleasas de restricción *XmnI*, *TaqI* o *AccI*. Los ADNs digeridos se separaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos del marcador está indicado en pares de bases (Tomado de Tannich and Burchard, 1991).

En otro intento por diferenciar entre cepas "P" y "NP" de *E. histolytica*, se construyó una biblioteca de ADNc usando ARN poli(A) de una cepa axénica de *E. histolytica* HM 1: IMSS la cual mostró un zimodemo "P". Analizando esta biblioteca se aisló una clona cepa específica de ADNc (C2) con una secuencia de 26 nt repetida en tandem 9 veces. Estudios de Northern y Southern blot de 4 cepas axénicas con

zimodemos "P" revelaron que este gen estaba presente y era expresado en *E. histolytica* HM1: IMSS y 200:NIH, pero no en las cepas patógenas HK-9 y Rahman. Utilizando esta clona de ADNc como sonda en estudios de hibridación tipo dot blot se observó que pudo discriminar entre cepas de *E. histolytica* con zimodemos "P" de aquellas con zimodemos "NP", (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de hibridación de "dot blot" de ADN de *Entamoeba histolytica* cultivada xénicamente usando la clona de ADNc C2 (Tomado de Burch, et. al., 1991).

| Cepa de <i>E. histolytica</i> | Zimodemo ^a | Antecedentes Clínicos ^b | Hibridación ^c |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|
| SAW 1453 XIV (P) | | ALA | + |
| SD53 | II (P) | Colitis | + |
| FAT957 | II (P) | ALA | + |
| SAW990 | XIV (P) | Colitis | + |
| SD92 | II (P) | Colitis | + |
| FAT1014 | II (P) | ALA | + |
| FAT967 | II (P) | ASX ^d | |
| SD11 | I (NP) | ASX, GM | - |
| SD126 | III (NP) | ASX, GM | - |
| SD130 | I (NP) | ASX, AIDS | - |
| SD116 | I (NP) | ASX, AIDS | - |
| SD107 | I (NP) | ASX, AIDS | - |
| FAT1010 | I (NP) | ASX | - |

^a Los números romanos designan grupos de zimodemos, tal como lo definieron Sargeant, et. al., 1978. P, zimodemo patógeno; NP, zimodemo no patógeno.

^b Abreviaturas: ALA, amebic liver abcess; ASX, asintomático; GM, hombre homosexual.

^c +, Hibridación; -, no hibridación.

^d Niño sudafricano, con serología amibiana positiva.

Una cualidad interesante de esta clona es que en estudios de Southern blot de ADN genómicos digeridos con *Eco* RI aislados de *E. histolytica* HM 1: IMSS, HK-9, 200 NIH y Rahman; *E. histolytica*-like Laredo; *E. invadens*; y *E. moshkovskii* permitió la diferenciación entre

cepas de *E. histolytica* con zimodemos "P" como la HM 1: IMSS y la 200 NIH. No hubo una explicación clara para la falta de hibridación de la HK-9 y la Rahman. Aun sin embargo estos datos nos muestran que existe heterogeneidad genética entre cepas axénicas poseedoras del mismo zimodemo y sugiere que múltiples sondas pueden ser necesarias para detectar diferencias entre cepas de *E. histolytica* "P" (Burch, et. al., 1991).

En otro esfuerzo para distinguir entre cepas de *E. histolytica* "P" y "NP", se amplificaron secuencias de ADN_r recombinante por PCR y se usaron como sondas para análisis de Southern blot. Dos de las clonas denominadas R-1 y R-2 al secuenciarse parcialmente mostraron que incluían parte del gen ribosomal 25S reportado por Huber, et. al., 1989. La otra clona BR-1 era un fragmento de restricción *Sau3A* de 800 bp. Analizando la secuencia parcial de esta clona se encontró una gran similitud con el extremo 3' de los genes de ARNr 25-28S. De estas tres sondas la R-1 y la BR-1 fueron capaces de demostrar diferencias entre los patrones de restricción polimórficos de cepas "P" y "NP" en estudios de Southern blot, la clona R-2, no detectó diferencias (Cruz-Reyes, et. al., 1992).

I.7 Genes clonados y secuenciados

Hasta 1992 el número de genes clonados de *Entamoeba histolytica* llegaba a 11:

- Edman, U., Meza, I. and Agabian, N. 1987. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84: 3024-3028.
- Huber, M., Garfinkel, L. Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. 1987. *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. Mol. Biochem. Parasitol. 24: 227-235.
- Huber, M., Garfinkel, L. Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. 1988. Nucleotide sequence analysis of an *Entamoeba histolytica* ferredoxin gene. Mol. Biochem. Parasitol. 31: 27-34.
- Eakin, A. E., Bouvier, J., Sakanari, J. A. C. S. and McKerrow, H. 1990. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 39: 1-8.

- Samuelson, J., Ayala, P., Orozco, E. and Wirth, D. 1990. Emetine-resistant mutants of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* 38: 281-290.
- Stanley, S: L. Jr., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L. and Li, E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87: 4976-4980.
- Torian, B. E., Flores, B. M., Stroehler, V. L., Hagen, F. S. and Stamm, W. E. 1990. cDNA sequence analysis of a 29 kDa cysteine rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87: 6358-6362.
- Mann, B. J., Torian, B. E., Vedvick, T. S. and Petri, W. A., Jr. 1991. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 3248-3252.
- Meester de, F., Bracha, R., Huber, M., Keren, Z., Rozenblatt, S. and Mirelman, D. 1991. Cloning and characterization of an unusual elongation factor 1-alfa cDNA from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 23-32.
- Tannich, E., and Horstmann, R. D. 1991. Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 1849-1853.
- Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R. and Horstmann, R. D. 1991. Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 266: 4798-4803.

El conocimiento de la secuencia nucleotídica de los genes anteriores permitió la elaboración de una tabla de frecuencia de uso de codones de *E. histolytica*, (tabla 2). Actualmente, el Banco de Genes (GeneBank) cuenta con 249 secuencias reportadas, de las cuales 59 corresponden a genes completamente secuenciados.

Tabla 2. Frecuencia de uso de codones en *Entamoeba histolytica* patógena (Tomado de Tannich and Horstmann, 1992).

| Amino ácido | Codón | Fre cuencia |
|----------------|-------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|----------------|
| Phe | TTT | 188 | Ser | TCT | 150 | Tyr | TAT | 380 | Cys | TGT | 318 |
| FA | TTC | 169 | Ser | TCC | 11 | Tyr | TAC | 73 | Cys | TGC | 41 |
| Leu | TTA | 226 | Ser | TCA | 318 | End | TAA | 17 | End | TGA | 2 |
| Leu | TTG | 75 | Ser | TCG | 4 | End | TAG | 2 | Trp | TGG | 107 |
| Leu | CTT | 248 | Pro | CCT | 32 | His | CAT | 135 | Arg | CGT | 21 |
| Leu | CTC | 30 | Pro | CCC | 4 | His | CAC | 32 | Arg | CGC | 0 |
| Leu | CTA | 11 | Pro | CCA | 344 | Gln | CAA | 286 | Arg | CGA | 17 |
| Leu | CTG | 4 | Pro | CCG | 0 | Gln | CAG | 13 | Arg | CGG | 0 |
| Ile | ATT | 466 | Thr | ACT | 291 | Asn | AAT | 530 | Ser | AGT | 175 |
| Ile | ATC | 75 | Thr | ACC | 49 | Asn | AAC | 107 | Ser | AGC | 43 |
| Ile | ATA | 43 | Thr | ACA | 342 | Lys | AAA | 615 | Arg | AGA | 263 |
| Met | ATG | 207 | Thr | ACG | 9 | Lys | AAG | 231 | Arg | AGG | 9 |
| Val | GTT | 425 | Ala | GCT | 259 | Asp | GAT | 530 | Gly | GGT | 165 |
| Val | GTC | 62 | Ala | GCC | 28 | Asp | GAC | 64 | Gly | GGC | 4 |
| Val | GTA | 126 | Ala | GCA | 318 | Glu | GAA | 709 | Gly | GGA | 483 |
| Val | GTG | 17 | Ala | GCG | 0 | Glu | GAG | 83 | Gly | GGG | 15 |

Las frecuencias están dadas por 10,000 codones.

1.8 Uso de codones

La información sobre el uso de codones de cualquier organismo es de particular importancia para:

1. Predecir el marco de lectura abierta de alguna secuencia nueva.
2. Diseñar oligonucleótidos a partir de una secuencia de aminoácidos.
3. Comparar el uso de codones de dos especies, y estimar el grado de homología en la expresión de genes.
4. El diseño y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación de secuencias de ADN por PCR.

En el análisis realizado de 4680 codones se observó que el contenido de A+T en los genes era de 67 %, lo cual estaba de acuerdo con la cantidad de A+T del genoma de *E. histolytica* de 63-77 % (López Revilla y Gómez Domínguez, 1988). El estudio del uso de codones reveló un empleo de codones sinónimos con una preferencia por los codones NNA y NNU. El uso de bases en la tercera posición del codón era de 44 % para U, 41.4 % para A, 8.2 % para C y 6.4 % para G. Los codones CGG (arg), GCG (ala), CGC (arg) y CCG (pro) no se encontraron en los genes examinados.

La frecuencia en el uso de codones difería considerablemente entre las especies (Wada, et. al. 1991), aun sin embargo el uso de codones de *E. histolytica* es parecido al de *Plasmodium falciparum*, con un coeficiente de correlación de 0.85 y al de *Dyctiostelium discoideum*

con un coeficiente de correlación de 0.79. Los codones preferidos por los dos organismos para todos los grupos de aminoácidos son los mismos, excepto leucina en el cual CUU es preferido a UUA en *E. histolytica*.

El número de codones secuenciados de *E. histolytica* no patógena es muy reducido (aproximadamente 878 codones), por lo cual es difícil establecer una comparación formal con la forma patógena. Aun así el análisis de los datos disponibles hasta 1992 no mostró diferencias importantes (Tannich and Horstmann, 1992; Char and Farthing, 1992).

En 1989, cuando iniciamos este trabajo, la información relacionada con los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *E. histolytica* era abundante: actividades de colagenasa (Gadasi, H. and Kessler, E., 1983; Muñoz, et. al., 1984) y enzimas proteolíticas (Gadasi, H. and Kobilier, D., 1983; Neal, 1960) muerte por contacto (Feingold, et. al. 1984; Ravdin, et. al., 1984; Bos, et. al., 1980; Ravdin, et. al., 1980) y resistencia a la acción del complemento (Reed, et. al., 1983; Calderon, J. and Tovar, R., 1986).

Asimismo el conocimiento de las características fisico-químicas de las proteinasas y su localización celular estaba muy avanzado (McLaughlin, J. and Faubert, G., 1977; Scholze, H. and Werries, E., 1984, 1986a, 1986b; Schulte, et. al., 1987; Keene, E. E. and McKerrow, J. 1985; Keene, et. al., 1986; Avila, E. et. al., 1985; Perez-Montfort, et. al., 1987 y Luaces and Barrett, 1988). Había algunos datos relacionados con la organización y caracterización del ADN (Cruz -Hernández de la, et. al., 1986; Perez-Mutul, et. al., 1986; Lopez-Revilla and Gomez, 1978; Lopez-Revilla and Gomez-Dominguez, 1988; Reeves, et. al., 1971; Albach, et al., 1980; Gelderman, et. al., 1971a; Gelderman, et. al. 1971b), localización del sitio de síntesis del ARN (Albach, et. al., 1977), caracterización parcial de las ARN polimerasas (Prachayasittikul and Albach, 1982; Vanik, et. al., 1986) y se habían ensayado varias metodologías para aislar y caracterizar las diferentes especies de ARNr (Albach, et. al., 1984; Stoner-Picking, et. al., 1986; Albach, 1989). Por otro lado se había logrado expresar algunos genes de *E. histolytica* (Mendoza, et. al., 1982; Leyva-Leyva, et. al., 1986). Solo había dos bibliotecas de ADNc, una construida en el bacteriófago lambda gt 11 (Edman, et. al., 1987) y la otra preparada en lambda gt 10 (Huber, et. al., 1987) y solamente dos genes habían sido clonados y secuenciados: el gen que codifica para la actina (Edman, et. al., 1987; Huber, et. al., 1987) y el gen que codifica para la ferredoxina (Huber, et. al., 1988). De aquí se desprendió nuestro interés y el de otros laboratorios simultáneamente por

estudiar los genes de *E. histolytica*, principalmente aquellos relacionados con su patogenicidad y virulencia, así como genes característicos de la fisiología de *E. histolytica* que sirvieran como blanco en algunas estrategias terapéuticas o bien con fines diagnósticos.

II. OBJETIVO

Nuestro interés se enfocó hacia la implementación de técnicas de biología molecular que permitieran profundizar en el estudio de la fisiología de *Entamoeba histolytica* para lograr una mejor comprensión de la amibiasis. De particular interés fue la clonación de un gen que codificaba para una proteínasa de bajo peso molecular de la membrana de *E. histolytica*, que consideramos estaba relacionada con el mecanismo de patogenicidad, así como genes relacionados con su metabolismo, que dieran la pauta para diseñar nuevas estrategias de diagnóstico, prevención y tratamiento para la infección causada por este protozooario.

III. MATERIALES Y METODOS

Para llevar a cabo la clonación del gene que codificaba para la proteinasa de *E. histolytica*, decidimos partir de una biblioteca de ADNc construida en un bacteriófago de expresión (λ gt 11), que nos permitiera realizar un tamizaje inicial con anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra la proteinasa. Las clonas que fueron reconocidas por los anticuerpos posteriormente fueron confirmadas con una sonda sintética dirigida hacia el gene que codificaba el extremo amino de una proteinasa parcialmente secuenciado (Luaces, A. L. and Barrett, A. J., 1988). Algunas clonas aisladas, después fueron amplificadas, para llevar a cabo la secuenciación del inserto.

III.1 Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron fueron: Y1088, Y1089 y Y1090.

Genotipos de las cepas

Y1088 *lac U169 sup E sup F hsdR met B trp R ton A21*
proC::Tn5 (pMC9)

Y1089 *dlacU169, d(lon,araD)169 srtA, hflA150 (chr::Tn10)* (pMC9)

Y1090 *lacU169 (lon,araD)139 strA supF(trpC::Tn10)*(pMC9)

La cepa Y 1088 es un hospedero que permite el crecimiento del fago λ gt 11. Contiene el supresor *supF* para permitir la lisis cuando el fago contiene la mutación S100 y también reprime al promotor *lac* portado por λ gt 11. El plásmido pMC9 dirige la síntesis de grandes cantidades del represor *lac* y también es portador de un gen de resistencia a la tetraciclina.

La cepa Y1089 se usó para tener al fago en estado lisogénico. La deleción *lon* estabiliza las proteínas fusionadas a la beta galactosidasa.

La cepa Y1090 se usó para llevar a cabo los tamizajes de los fagos recombinantes. Esta cepa también contiene la deleción *lon* que da estabilidad a los péptidos de fusión y el *Sup F* suprime la mutación S100 (Miller, 1987).

III.2 Construcción de una biblioteca de ADN complementario

La construcción de una biblioteca de ADNc tiene la ventaja sobre una biblioteca de ADN genómico, de ser preparada a partir de ARNm total, lo que elimina la presencia de secuencias intrónicas presentes en el ADN de eucariontes y permite tener una buena representatividad del genoma. La biblioteca de ADNc de *E. histolytica* cepa HM1: IMSS, fue

preparada en el fago lambda gt 11, que es un fago que permite expresar la información genética en forma de péptidos fusionados a la beta galactosidasa. El tamaño de esta biblioteca fue de 575000 fagos recombinantes, y nos fue generosamente proporcionada por la Dra. Isaura Meza y el Dr. Marco Antonio Meraz (CINVESTAV, IPN). Esta biblioteca se elaboró de acuerdo a los métodos estándares de biología molecular (Gubler and Hoffman, 1983; Davis, et al., 1986).

Brevemente se describe la estrategia para contruir una biblioteca de ADNc:

Primeramente se obtiene el ARN total utilizando tiocianato de guanidina (Chirgwin, et. al., 1979) y posteriormente se seleccionan los ARN poliadenilados (ARNm), con oligo(dT)-celulosa. A continuación, utilizando una transcriptasa reversa se prepara la primera cadena de ADNc complementario a los ARNm. La segunda cadena de ADNc, se prepara tomando como molde la primera hebra y utilizando Ribonucleasa H y ADN polimerasa I. Este ADNc de doble cadena, posteriormente es metilado con una *Eco* RI metilasa para proteger los sitios de restricción. Se emparejan los extremos con ADN polimerasa y posteriormente se añaden los acopladores para *Eco* RI, utilizando una ligasa, para después generar extremos cohesivos de clonación *Eco* RI. El tamaño de los insertos se homogeneiza por electroforesis en un gel de poliacrilamida y finalmente se efectúa la ligación con los brazos de lambda gt 11 digeridos previamente con *Eco* RI y desfosforilados.

La ligación se hizo de acuerdo al siguiente protocolo:

| | tubo | | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F |
| Brazos de lambda gt 11 | 1 µL |
| Amortiguador para ligasa 10 X | 1 µL |
| Inserto control | --- | 1 µL | --- | --- | --- | --- |
| Inserto de ADNc | --- | --- | 1 µL | 2 µL | 3 µL | 5 µL |
| Agua destilada | 7 µL | 6 µL | 6 µL | 5 µL | 4 µL | 2 µL |
| Ligasa T4 | 1 µL |

Los tubos se incuban a 14 °C durante 4 horas.

Para llevar a cabo el empaquetamiento se utiliza un extracto de empaquetamiento comercial (Packagene de Promega Biotech). La ligación de

cada tubo se adiciona al extracto de empaquetamiento (un tubo de empaquetamiento por cada ligación) y se incluyen 2 controles más:

G 0.25 μ g de ADN de lambda gt 11 SIN cortar

H 0.25 μ g de brazos de lambda gt 11 sin ligar (equivalente al tubo B, pero SIN T4 ligasa). Después, las reacciones de empaquetamiento se incuban a 22 °C durante 2 horas. Finalmente cada tubo se diluye a 250 μ L con amortiguador TMG y se almacena a 4 °C.

III.3 Diseño de una sonda sintética de ADN

Para el diseño de una sonda sintética que nos permitiera analizar la biblioteca de ADNc nos basamos en la secuencia de 20 aminoácidos del extremo amino terminal de una proteinasa de cisteína de bajo peso molecular de la membrana de *Entamoeba histolytica*, (histolisina) purificada por afinidad y secuenciada parcialmente. Revisando la secuencia de aminoácidos reportada, se encontró que seis de ellos no estaban identificados. Comparando esta secuencia de aminoácidos con la secuencia del extremo amino de la papaína (Cohen, et. al., 1986), se encontró una alta homología, (figura 6) (Luaces and Barrett, 1988).

Histolisina: X- Pro- Glu-Ser-Val-Asp--X - Arg-Gln- X- Gli- X- Val-Thr-Pro- Ile- X- X- Gln- Gly
 Papaína: Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp--Trp-Arg-Gln-Lys-Gli-Ala-Val-Thr-Pro-Val -Lys- Asn-Gln- Gly

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos del extremo amino de la histolisina y la papaína (Tomado de Luaces and Barrett, 1988).

Para diseñar una sonda que codificara para el extremo amino terminal de la histolisina era necesaria esta información y una tabla de uso de codones. Se calculó la frecuencia de uso de codones en base a los reportes existentes en 1989 para los genes de actina y ferredoxina, (Edman, et. al., 1987; Huber, et. al., 1988), (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de uso de codones de *Entamoeba histolytica* en 435 aminoácidos (actina+ferredoxina)

| | | | | | |
|-----|--------------------------|-----|--|-----|--------------------------|
| Ala | 18 GCT 5 GCC 7 GCA | Lys | 12 AAA 11 AAG | Val | 24 GTT 3 GTA 6 GTC |
| Arg | 17 AGA 1 CGT | Met | 19 ATG | | |
| Asn | 11 AAT 6 AAC | Phe | 11 TTC 2 TTT | | |
| Asp | 23 GAT 3 GAC | Pro | 23 CCA | | |
| Cys | 7 TGT 7 TGC | Ser | 16 TCA 1 TCC 2 AGC 2 AGT 3 TCT | | |
| Gln | 12 CAA | | | | |
| Glu | 35 GAA | | | | |
| Gly | 22 GGA 14 GGT | Thr | 14 ACT 5 ACA 5 ACC | | |
| His | 6 CAT 4 CAC | | | | |
| Ile | 27 ATT 4 ATC | Trp | 4 TGG | | |
| Leu | 22 CTT 4 TTA 2 CTC | Tyr | 13 TAT 2 TAC | | |

Diseñamos la secuencia, así como la cadena complementaria y le añadimos en ambos extremos la secuencia de acopladores para *Bam* HI. En los sitios en los cuales no se identificaron los aminoácidos, se incluyeron las secuencias correspondientes a los aminoácidos de la papaína. Mandamos sintetizar ambos oligonucleótidos a la Universidad del Estado de Pennsylvania, (figura 7).

Ile- Pro- Glu- Ser- Val- Asp-Trp- Arg- Gln- Lys- Gli- Ala- Val Thr- Pro-Ile- Lys Asn- Gln- Gli
 5'-ATT CCA GAA TCA GTT GAT TGG AGA CAA AAA GGA GCT GTT ACT CCA ATT AAA AAT CAA GGA-3'
 3'-TAAGGT CTT AGT CAA CTA ACC TCT GTT TTT CCT CGA CAA TGA GGT TAA TTT TTA GTT CCT-5'

Figura 7. Secuencia de nucleótidos de la sonda sintética.

III.4 Marcaje de la sonda sintética de ADN

Para evidenciar la hibridación de la sonda sintética con las clonas poseedoras de la secuencia complementaria, se utilizaron dos tipos de marca: biotina y dATP (^{32}P) El marcaje se llevó a cabo de acuerdo al sistema de traducción por corte (Nick Translation System, de Bethesda Research Laboratories).

III.5 Producción de anticuerpos antiproteinasa

Dado que teníamos una biblioteca de expresión, pensamos que un enfoque inicial podría ser rastrear aquellas clonas productoras de proteinasa o porciones de ésta, utilizando anticuerpos específicos antiproteinasa. La inducción de anticuerpos antiproteinasa se realizó inmunizando un conejo blanco Nueva Zelanda de 3 Kg con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa (peso molecular 27000 daltones) en NaCl 0.15 M y mezclada con adyuvante completo de Freund (volumen/volumen). La inmunización se efectuó por vía intramuscular, dando un refuerzo más a los 15 días en condiciones idénticas a la primera inmunización. Se dejó transcurrir otros 15 días y se dió un segundo refuerzo con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa en solución salina 0.15 M, por vía intraperitoneal. A los 15 días se hizo una sangría de prueba y al demostrar la presencia de anticuerpos por doble inmunodifusión se efectuó una sangría a blanco. Los anticuerpos se purificaron por precipitación de la fracción gama globulina con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33 % y posteriormente por cromatografía de afinidad en una columna de sefarosa 4B-ditiopiridil-disulfuro-proteinasa de 1.8 cm de diámetro por 30 cm de largo (Brocklehurst, et. al., 1974). Los anticuerpos antiproteinasa se eluyeron modificando el pH con una solución de HCl 0.01

N pH 2.0 y se neutralizaron con Tris en polvo. Los anticuerpos se guardaron a 20 °C hasta su uso (Ostoa-Saloma, P., 1990: comunicación personal).

III.6 Marcaje de proteína A con ¹²⁵I

Para detectar aquellas clonas que fijaron anticuerpos antiproteinasa, usamos proteína A radiactiva, que tiene una gran afinidad por la región Fc (fracción constante) de los anticuerpos, (Markwell, 1982).

III.7 Tamizaje de la biblioteca de ADNc usando anticuerpos

Para llevar a cabo el tamizaje de la biblioteca de ADNc, con anticuerpos policlonales se utilizó un cultivo de *Escherichia coli* Y1090, y se siguieron las recomendaciones de: Young and Davis, 1983 y Ausubel, *et. al*, 1987).

III.7.1. Selección de clonas positivas

Para seleccionar las clonas positivas se colocó el filtro de nylon con la cara hacia abajo, como si estuviera sobre la caja de petri en un negatoscopio. Posteriormente se alineó la autorradiografía sobre el filtro haciendo coincidir la esquina que se recortó. Después se colocó la caja de petri sobre la autorradiografía haciendo coincidir las marcas asimétricas de tinta china que se hicieron en el filtro y el agar de la caja de petri. A continuación se procedió a recortar las placas líticas que coincidieron con los puntos de la autorradiografía. La placa lítica contenida en el trozo de agar se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 1 mL de medio de suspensión (SM) (ver anexo A) y una gota de cloroformo para liberar a los bacteriófagos. Las clonas seleccionadas de esta manera se designaron como: CLA 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 respectivamente.

III.8 Hibridación en placa

Para confirmar que efectivamente las clonas reconocidas por los anticuerpos antiproteinasa codificaban para la proteinasa, decidimos tomar una de las clonas seleccionadas con anticuerpos (CLA 13) y realizar una hibridación en placa con la sonda sintética descrita anteriormente. Para realizar la hibridación en placa se procedió a producir placas líticas aisladas y se transfirieron a filtros de nylon, tal como se efectuó en la selección de clonas con anticuerpos, (Maniatis, *et. al.*, 1982).

III.8.1 Detección de la sonda biotinilada

Para localizar las clonas que hibridaron con la sonda, el filtro se puso a rehidratar en la solución amortiguadora 1 (ver anexo A) por 1 minuto a temperatura ambiente. Después se transfirió al amortiguador 2 (BSA al 3 % disuelta en el amortiguador 1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el filtro se incubó en una solución de estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP; $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en amortiguador 1 por 10 minutos a temperatura ambiente, pipeteando constantemente la solución sobre el filtro con una pipeta Pasteur. El exceso de SA-AP se eliminó con un par de lavados usando un volumen de amortiguador 1, 40 veces mayor que el volumen empleado en el paso anterior. Después los filtros se pasaron al amortiguador 3 (ver anexo A), por 10 minutos. A continuación se eliminó el exceso de amortiguador y el filtro se colocó en una bolsa de hibridación, a la cual se le adicionó el sustrato para la fosfatasa alcalina (7.5 mL del amortiguador 3, 33 μL de NBT y 25 μL de BCIP). El filtro se incubó en una caja para evitar la luz directa y se dejó toda la noche. Para detener la reacción el filtro se colocó en una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, etilendiaminotetraacetato (EDTA) 0.5 mM. (BlueGene System, Bethesda Research Laboratories (BRL)). Las clonas detectadas con este procedimiento se designaron como: CLP 13.1, 13.2, 13.3, 13.4, 13.5, 13.6, 13.7, 13.8 y 13.9 respectivamente.

III.9 Obtención del ADN de bacteriófago lambda gt 11

Para la obtención del ADN de los bacteriófagos de las clonas CLA 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 y de las clonas CLP 13.1, 13.2, 13.3, 13.4, 13.5, 13.6, 13.7, 13.8, 13.9 se prepararon placas líticas en confluencia, utilizando como bacteria hospedera a *Escherichia coli* Y1090, en cajas de Petri de 150 mm. Se procedió de la misma manera que como se hizo para la producción de placas líticas para el tamizaje de la biblioteca de ADNc, solo que aumentando el número de bacteriófagos, (Lockett, J. T., 1990).

III. 10 Hibridación en punto (dot blot)

Para tamizar rápidamente el ADN obtenido de las clonas descritas anteriormente, utilizamos la hibridación en punto. Esta es una técnica muy valiosa para analizar un gran número de muestras de ADN provenientes de células transformantes, células en cultivo, células sanguíneas, muestras de tejidos sólidos, etc., (Maniatis, et. al., 1982).

III.11 Hibridación directa en gel de agarosa

Tratando de reducir el tiempo de análisis de los ADNs obtenidos anteriormente, utilizamos la hibridación directa en gel de agarosa. Para efectuar este tipo de hibridación se sometieron las muestras de ADN a electroforesis horizontal en agarosa 0.8 % (BRL) en un amortiguador de TBE 1X (ver anexo A). Las bandas de ADN fueron evidenciadas con bromuro de etidio (0.5 µg/mL en agua destilada). Se tomó la fotografía correspondiente y se siguió el método de Gontijo, et. al., 1990.

III.12 Hibridación tipo Southern

Otro enfoque para analizar los ADNs de las clonas seleccionadas fue realizar la hibridación clásica de Southern, E: M., 1975.

III.13 Amplificación de los insertos de las clonas 7 y 12 por PCR

Los insertos de las clonas 7 y 12 se amplificaron por 25 ciclos en un termociclador Cole-Parmer para PCR. Los oligonucleótidos que se usaron para la fase de amplificación eran específicos para lambda gt 11 con sitios de restricción para las endonucleasas *Sst* I y *Sal* I, y nos fueron obsequiados por el Dr. Abraham Landa del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. La amplificación se realizó de la siguiente manera: desnaturalización 94 °C por 1 minuto, alineamiento de los oligonucleótidos (primers) a 50 °C por 3 minutos y la reacción de polimerización a 72 °C por 1 minuto.

La mezcla de amplificación (50 µL) se lavó con cloroformo y se precipitó con 5 µL de acetato de sodio 3 M, pH 4.8 y 150 µL de etanol absoluto frío (-20 °C). Los tubos se guardaron en un ultracongelador (-70 °C), durante 1 hora para favorecer la precipitación. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga a 4 °C. El precipitado se lavó en etanol al 70 % frío y se deshidrató al vacío. El ADN se resuspendió en 100 µL de TE. Finalmente los insertos se rellenaron utilizando ADN polimerasa (fragmento Klenow) (Maniatis, et. al., 1982).

III.14 Secuenciación por el método de Sanger

Para llevar a cabo la secuenciación los insertos se digirieron con *Sst* I y *Sal* I y se ligaron al plásmido pPTZ 18R (Pharmacia). El vector recombinante se usó para transformar *Escherichia coli* TG1 (Mandel, and Higa, 1970), de donde se purificaron los templados de una sola cadena para ser secuenciados por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos (Sanger, et. al. 1977).

IV. RESULTADOS

IV.1 Aislamiento de clonas de ADNc de *Entamoeba histolytica* usando anticuerpos.

La selección de clonas de ADNc de la biblioteca de *E. histolytica* empacada en el bacteriófago lambda gt 11 usando los anticuerpos policlonales antiproteinasa producidos en conejo, nos permitió identificar en la autorradiografía 9 clonas positivas, las cuales se designaron como CLA 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 que se muestran en la figura 8. Estas clonas se almacenaron en SM a 4 °C para su caracterización posterior.

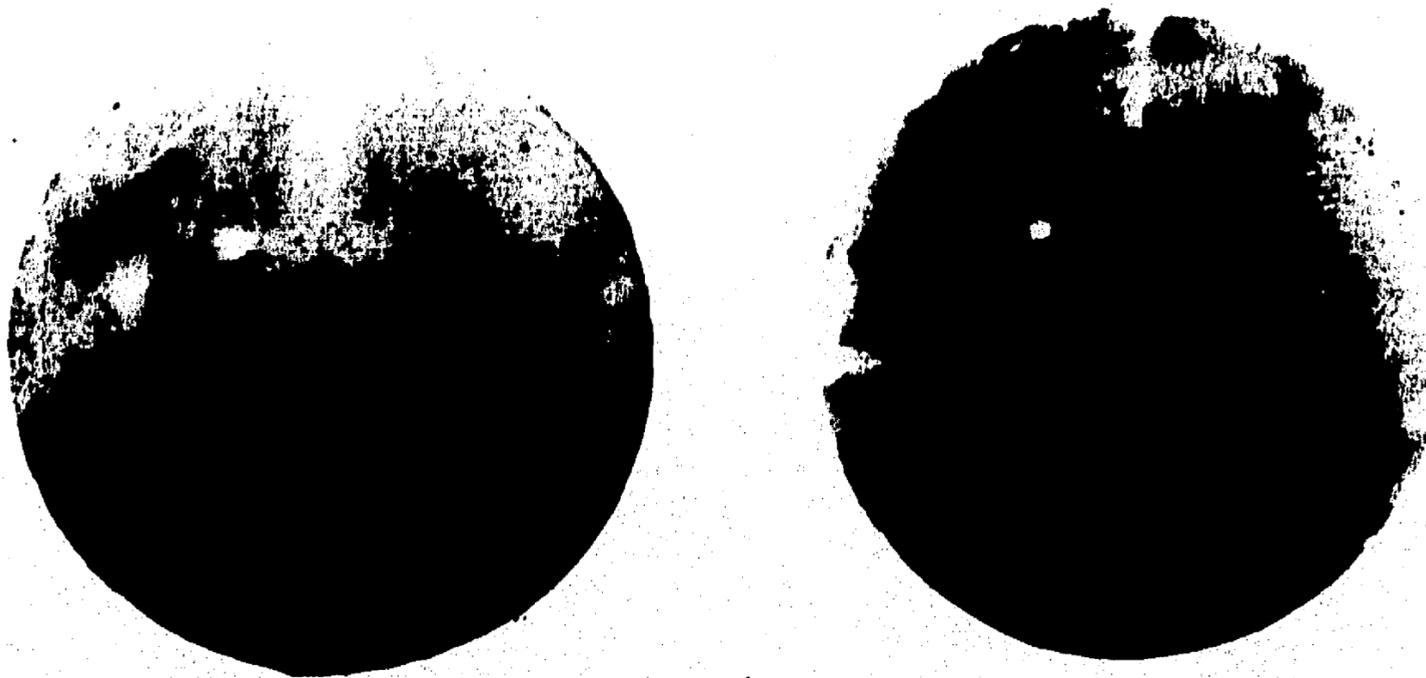


Figura 8. Autorradiografías que muestran las clonas de la biblioteca de ADNc de *E. histolytica* reconocidas por un anticuerpo antiproteinasa y proteína A marcada con ¹²⁵I.

IV.2 Hibridación en placa de una de las clonas aisladas

Para verificar si una de las clonas seleccionadas con anticuerpos poseía la secuencia de la proteinasa, se eligió al azar la clona CLA 13. Se hicieron diluciones 1:100 y 1:1000 de la clona mencionada para obtener placas líticas independientes y transferirlas a un filtro de nylon para su hibridación posterior con una sonda sintética de ADN de doble cadena marcada con biotina. En la figura 9 se observan las placas líticas que hibridaron con la sonda en forma de círculos discretos bien definidos. Se aislaron 9 placas líticas y se designaron como: CLP 13.1, 13.2, 13.3, 13.4, 13.5, 13.6, 13.7, 13.8 y 13.9. Estas placas se recortaron del gel de agarosa y se almacenaron en SM a 4 °C para su análisis subsecuente.

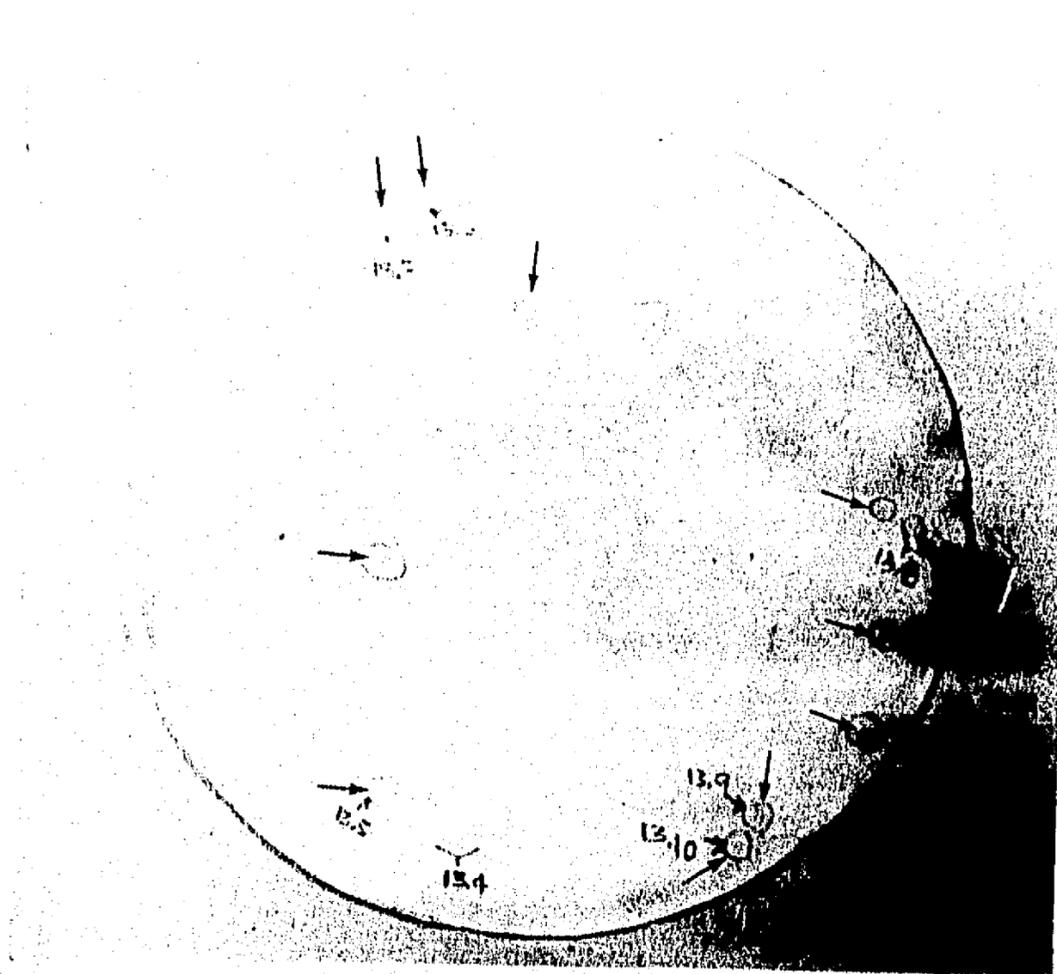


Figura 9. Hibridación de placas líticas transferidas a un filtro de nylon, con una sonda sintética de ADN de doble cadena marcada con biotina

IV.3 Hibridación en punto (dot blot) de ADNc de las clonas seleccionadas por anticuerpos y por la sonda sintética de ADN biotinilada

Al observar los resultados de hibridación de la clona CLA 13 con la sonda sintética biotinilada, pensamos que sería conveniente analizar todas las clonas, tanto aquellas seleccionadas con anticuerpos policlonales como las obtenidas posteriormente la efectuar la hibridación con la sonda sintética biotinilada. En la figura 10 se muestra la hibridación en punto (dot blot) de los ADNc de las clonas seleccionadas tanto por anticuerpos como por la sonda sintética de ADN. Aquí observamos que hibridaron los ADNc con distinta intensidad. También se incluyó ADN del bacteriófago lambda gt 11 silvestre como control negativo y la misma sonda sin biotinilar como control positivo.

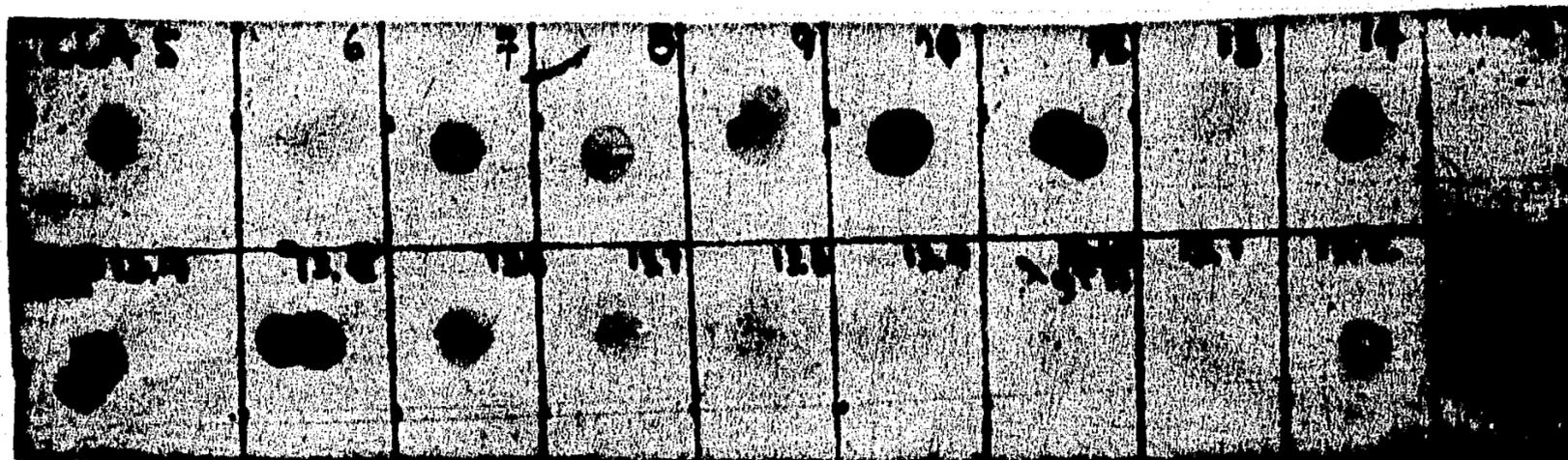


Figura 10. Hibridación en punto usando una sonda marcada con biotina. A. ADN de clonaseleccionadas con anticuerpos: 1. CLA 5; 2. CLA 6; 3. CLA 7; 4. CLA 8; 5. CLA 9; 6. CLA 11; 7. CLA 12; 8. CLA 13; 9. CLA 14; 10. ARNm total de *E. histolytica*. B. ADN de las clonas seleccionadas con la sonda biotinilada. 1. CLP 13.4; 2. CLP 13.5; 3. CLP 13.6; 4. CLP 13.7; 5. CLP 13.8; 6. CLP 13.9; 7. ADN del bacteriófago lambda silvestre; 8. ADN CLP 13.1; 9. ADN CLA 13.2; 10. Sonda sintética de ADN de doble cadena.

IV.4 Hibridación directa en gel de agarosa con una sonda sintética de ADN biotinilada.

Para ver si las clonas seleccionadas por la sonda sintética poseían insertos de distinto tamaño, se escogieron las clonas: CLP 13.3, CLP 13.6 y CLP 13.7, se obtuvo el ADN y sin digerir, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0.8 % en amortiguador de TBE 1X. El gel de agarosa conteniendo las muestras se hibridó directamente con la misma sonda biotinilada con la cual se seleccionaron las clonas, observando un barrido en los carriles correspondientes al ADN de las clonas. Como control positivo incluimos la sonda sintética de ADN sin biotinilar y como control negativo usamos el ADN del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind* III, normalmente usado como marcador de peso molecular, (figura 11).

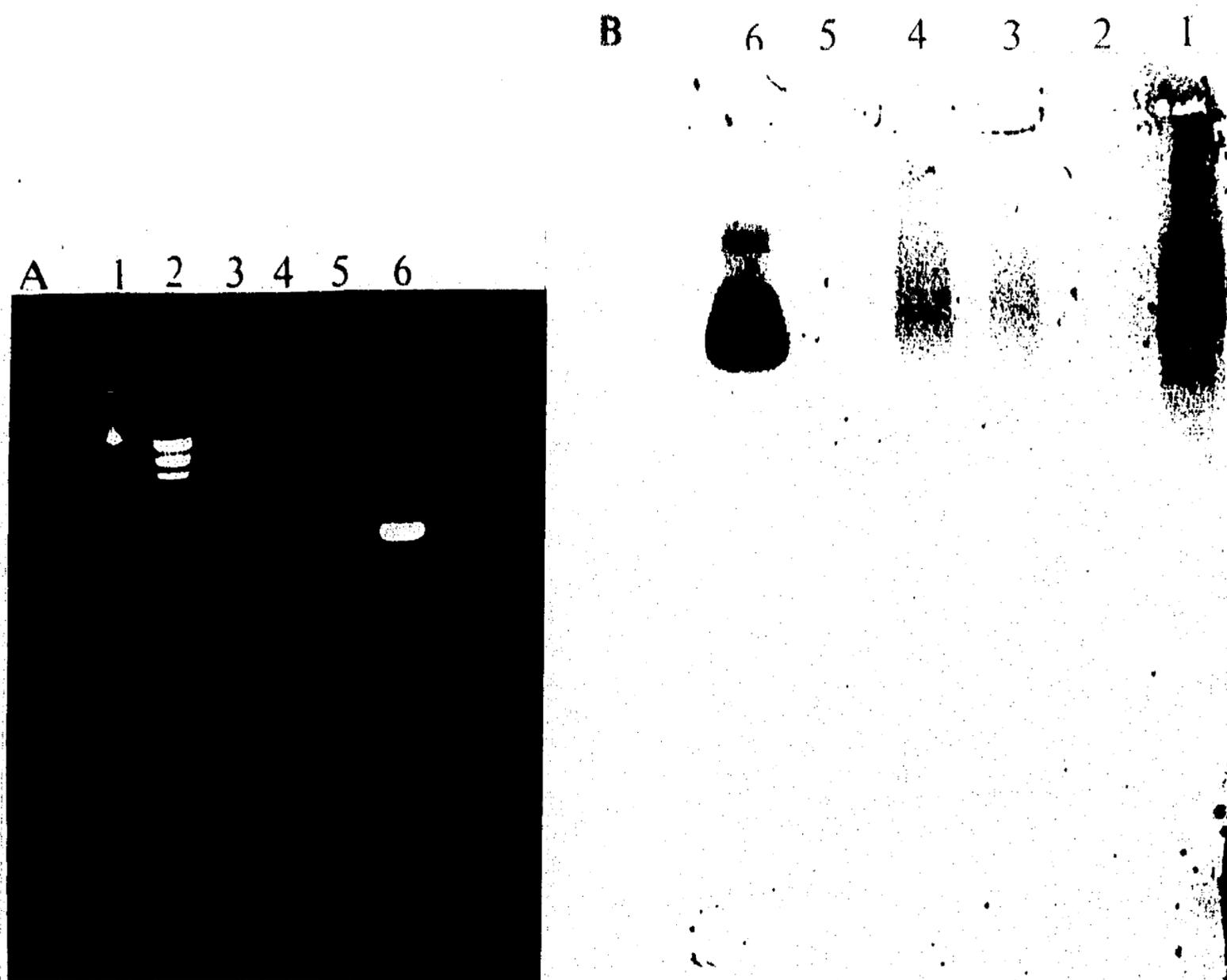


Figura 11. A. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando como amortiguador TBE 1X. Carriles: 1. ADN de la clona CLP 13.6; 2. ADN del bacteriófago lambda digerido con *Hind* III; 3. ADN de la clona CLP 13.7; 4. ADN de la clona 13.3; 5. vacío; 6. Sonda de ADN de doble cadena. B. Hibridación directa del gel de la fotografía A, con una sonda de ADN biotinilada.

IV.5 Hibridación directa en gel de agarosa con una sonda sintética de ADN radiactiva

Tratando de encontrar diferencias en los patrones de digestión de las clonas CLA 13 y CLP 13.6 se digirieron con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI (figura 12). Aunque los ADNs no migraron con uniformidad, se alcanzan a apreciar patrones similares. Este gel se secó y tratando de aumentar la sensibilidad, se puso a hibridar con la sonda sintética de ADN marcada con dATP radiactivo (^{32}P). En la autorradiografía se observan claramente bandas de hibridación en los carriles 3 y 5 respectivamente.

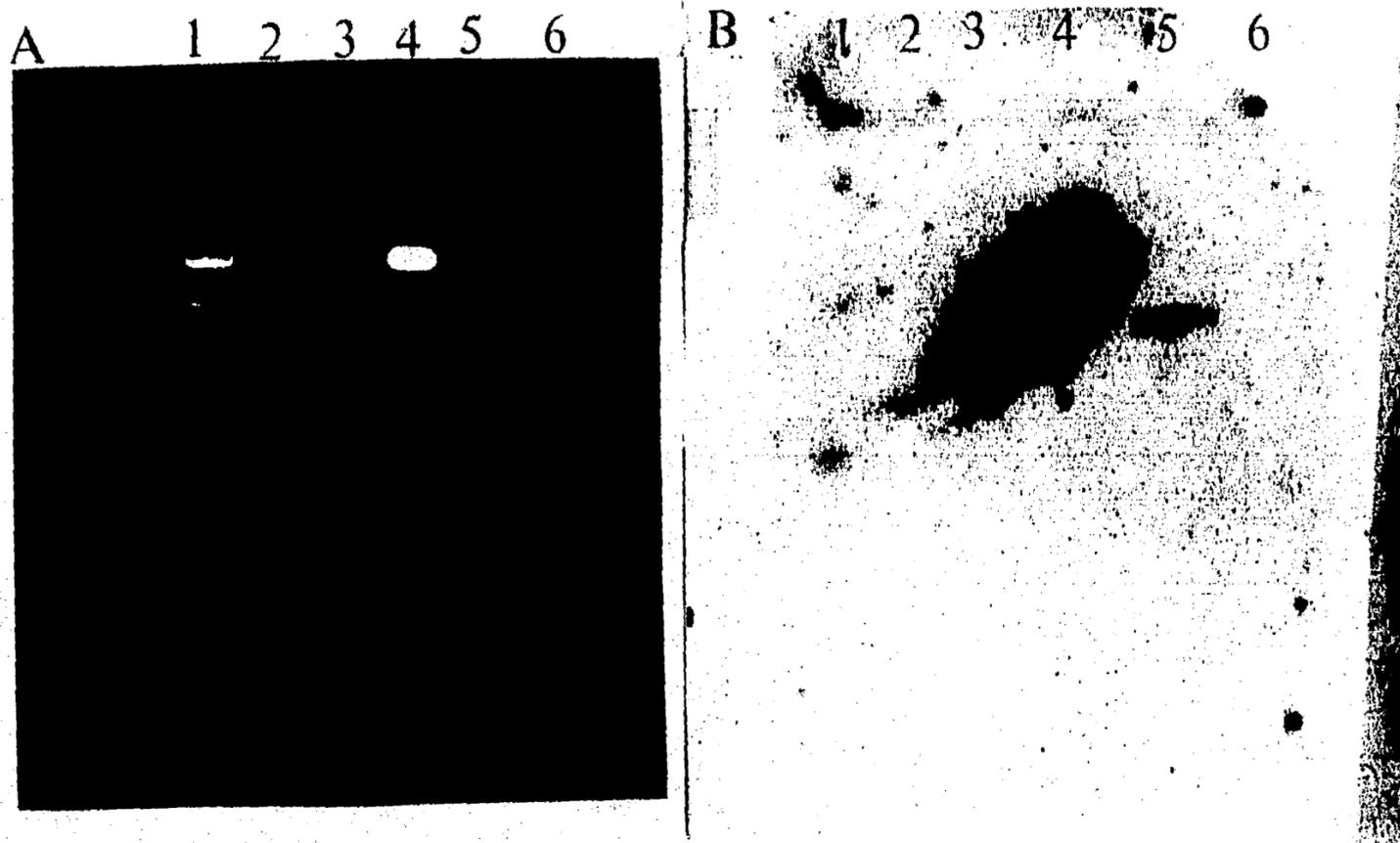


Figura 12. A. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando amortiguador de TBE 1X, Carriles: 1. ADN de bacteriófago lambda digerido con *Hind* III; 2. ADN de la clona CLA 13 digerida con *Eco* RI; 3. ADN de la clona CLA 13 digerida con *Bam* HI; 4. Sonda de ADN de doble cadena sin biotinar; 5. ADN de la clona 13.6 digerida con *Eco* RI; 6. ADN de la clona 13.6 digerida con *Bam* HI. B. Autorradiografía del gel deshidratado e hibridado con la sonda de ADN de doble cadena marcada con ^{32}P .

IV.6 Southern blot de los ADNs de las clonas seleccionadas con antiproteinasa

Dado que en los 2 experimentos anteriores no habíamos tenido una buena resolución en los patrones de hibridación, decidimos probar con el Southern blot tradicional. La figura 13A, muestra los patrones de migración de los ADNs sin digerir de 9 clonas seleccionadas por anticuerpos, ADN de *E. histolytica*, ARNm total de *E. histolytica* y también se incluyeron los ADNs del bacteriófago lambda gt 11 silvestre y de las cepas de *Escherichia coli* Y1088 y Y1090 como controles negativos. Se hizo la transferencia a un filtro de nylon y se hibridó con la sonda biotinilada. Aquí se observaron bandas de hibridación en los carriles que contenían los ADNs de las clonas 5, 7, 8, 9, 12, 13 y 14. Fue de llamar la atención que los carriles que contenían ADN de lambda digerido con *Hind* III como marcador de peso molecular y ADN de *E. coli* Y1088, también mostraron bandas de hibridación. Por el contrario no se encontraron bandas en los carriles correspondientes al ADN de *E. histolytica* y ARNm total de *E. histolytica* (figura 13B).

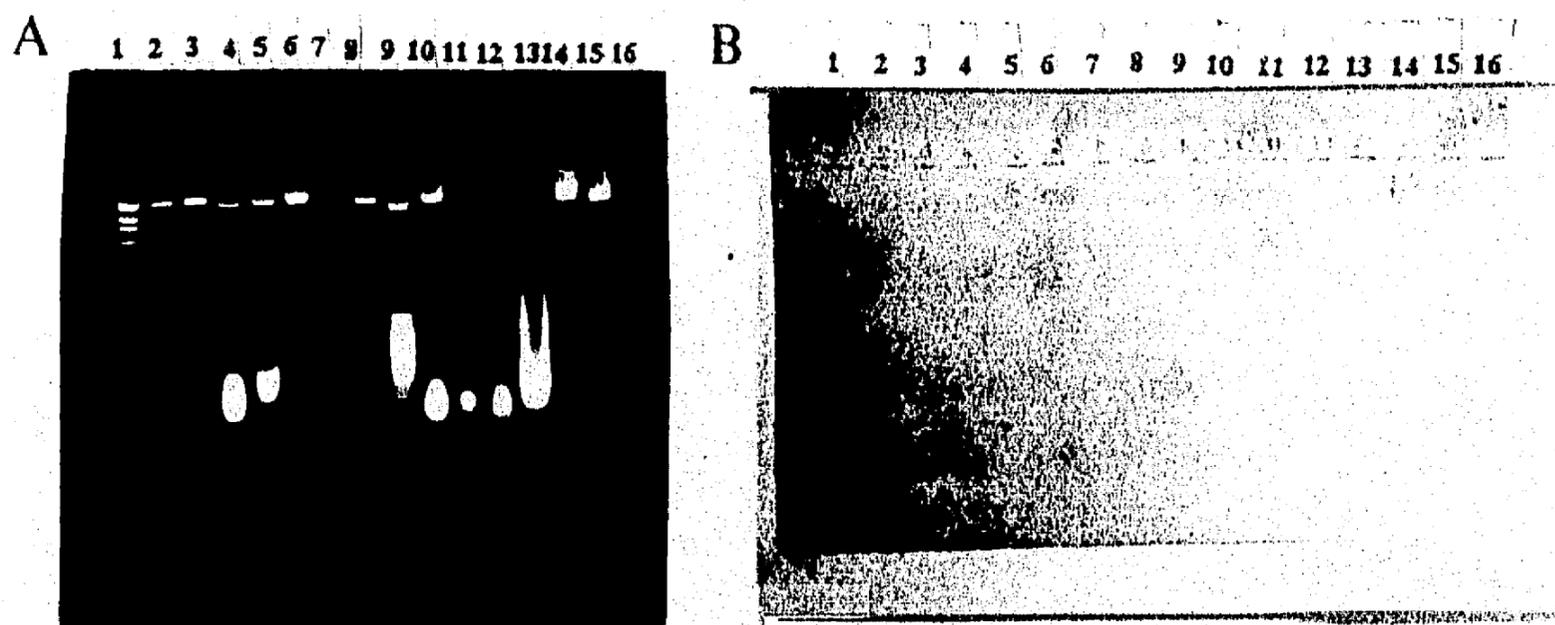


Figura 13. A. Electroforesis de ADN en agarosa 0.8 % usando TBE 1X como amortiguador. Carriles: 1 Lambda *Hind* III, 2. CLA 5, 3. Lambda gt 11 "silvestre", 4. CLA 6, 5. *E. coli* Y1088, 6. CLA 7, 7. vacío, 8. CLA 8, 9. *E. coli* Y1090, 10. CLA 9, 11. *E. histolytica* HM: 1 IMSS, 12. CLA 11, 13. ARNm total, 14. CLA 12, 15, CLA 13, 16. CLA 14. B. Southern blot de ADN usando una sonda biotinilada. Carriles: 1 Lambda *Hind* III, 2. CLA 5, 3. Lambda gt 11 "silvestre", 4. CLA 6, 5. *E. coli* Y1088, 6. CLA 7, 7. vacío, 8. CLA 8, 9. *E. coli* Y1090, 10. CLA 9, 11. *E. histolytica* HM: 1 IMSS, 12. CLA 11, 13. ARNm total, 14. CLA 12, 15, CLA 13, 16. CLA 14.

IV.7 Southern blot del ADN de las clonas 7, 9 y 12

De la hibridación tipo Southern realizada anteriormente se seleccionaron 3 clonas que hibridaron con la sonda sintéticabiotinilada: CLA 7, 9 y 12. El ADN de las clonas 7, 9 y 12 que se sometió a digestión con *Bam* HI, mostró patrones electroforéticos similares, consistentes en 2 bandas principales (23.1 y 6.5 kb respectivamente) y una de menor intensidad de 10 kb, (figura 14A). También se trató con la misma enzima el ADN de *E. histolytica* y el ADN del bacteriófago lambda gt 11 silvestre. Se realizó la transferencia tipo Southern y el filtro se hibridó con la sonda sintética biotinilada observando marcada hibridación en todos los carriles, (figura 14B).

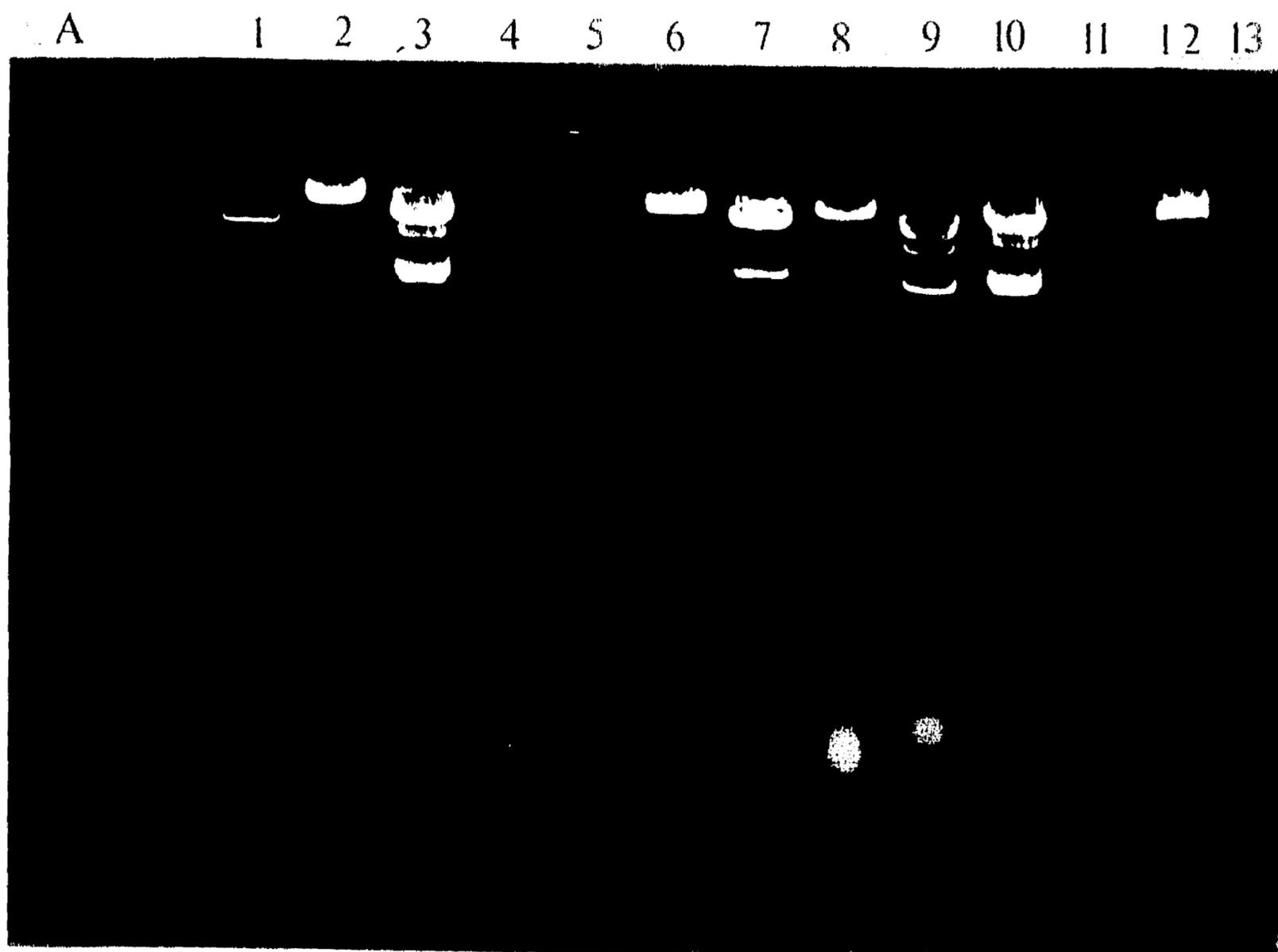


Figura 14. A. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando TBE 1X.

Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de CLA 7, 3. ADN de CLA 7+Bam HI, 4. ADN de *E. histolytica*, 5. ADN de *E. histolytica*+Bam HI, 6. ADN de lambda gt 11 silvestre, 7. ADN de lambda gt 11 silvestre+Bam HI, 8. ADN de CLA, 9. ADN de CLA 9+Bam HI, 10. ADN CLA 12+ Bam HI, 11. Carril vacío, 12. ADN CLA 12, 13. Carril vacío.

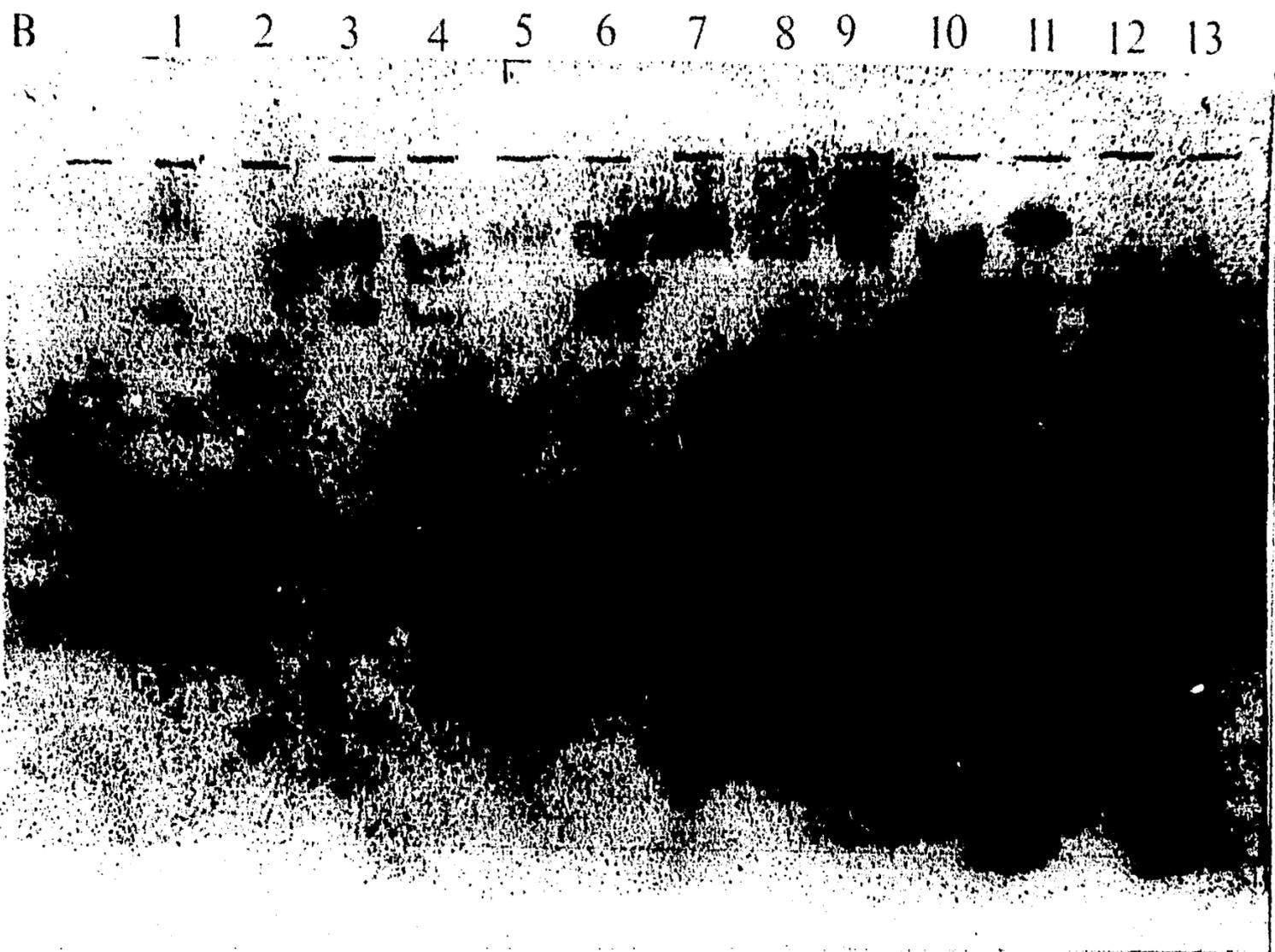


Figura 14 B. Southern blot usando una sonda sintética biotinilada: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de CLA 7, 3. ADN de CLA 7+ Bam HI, 4. ADN de *E. histolytica*, 5. ADN de *E. histolytica*+Bam HI, 6. ADN de lambda gt 11 silvestre, 7. ADN de lambda gt 11 silvestre+ Bam HI, 8. ADN de CLA, 9. ADN de CLA 9+Bam HI, 10. ADN CLA 12+ Bam HI, 11. Carril vacío, 12. ADN CLA 12 , 13. Carril vacío.

IV.8 Patrones de digestión de las clonas 7 y 12 y de los insertos respectivos

De las clonas que hibridaron con la sonda sintética se escogieron 2: la clona 7 y 12 así como sus insertos respectivos para someterlos a digestión con distintas enzimas de restricción, para escoger las enzimas adecuadas para digerir los insertos y el vector de secuenciación. Se ensayaron 7 enzimas de restricción: *Sal* I, *Sst* I, *Pst* I, *Xho* I, *Bam* HI, *Hind* III y *Pvu* II.

En la figura 15 A y B se observa la digestión del ADN de la clona 7 y del inserto respectivo amplificado por PCR, con las enzimas: *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* I, *Pvu* II, *Xho* I y *Sst* I. En la figura 16 A y B se muestra los patrones de digestión de la clona 12 y del inserto correspondiente, realizado con las mismas enzimas de restricción que en la figura 15. Para completar los patrones de digestión de las clonas 7 y 12 y sus respectivos insertos se incluyó una digestión más con la enzima de restricción *Sal* I (figura 17). De las enzimas de restricción ensayadas se escogieron *Sst* I y *Sal* I, para digerir al vector y a los insertos en los experimentos de secuenciación.

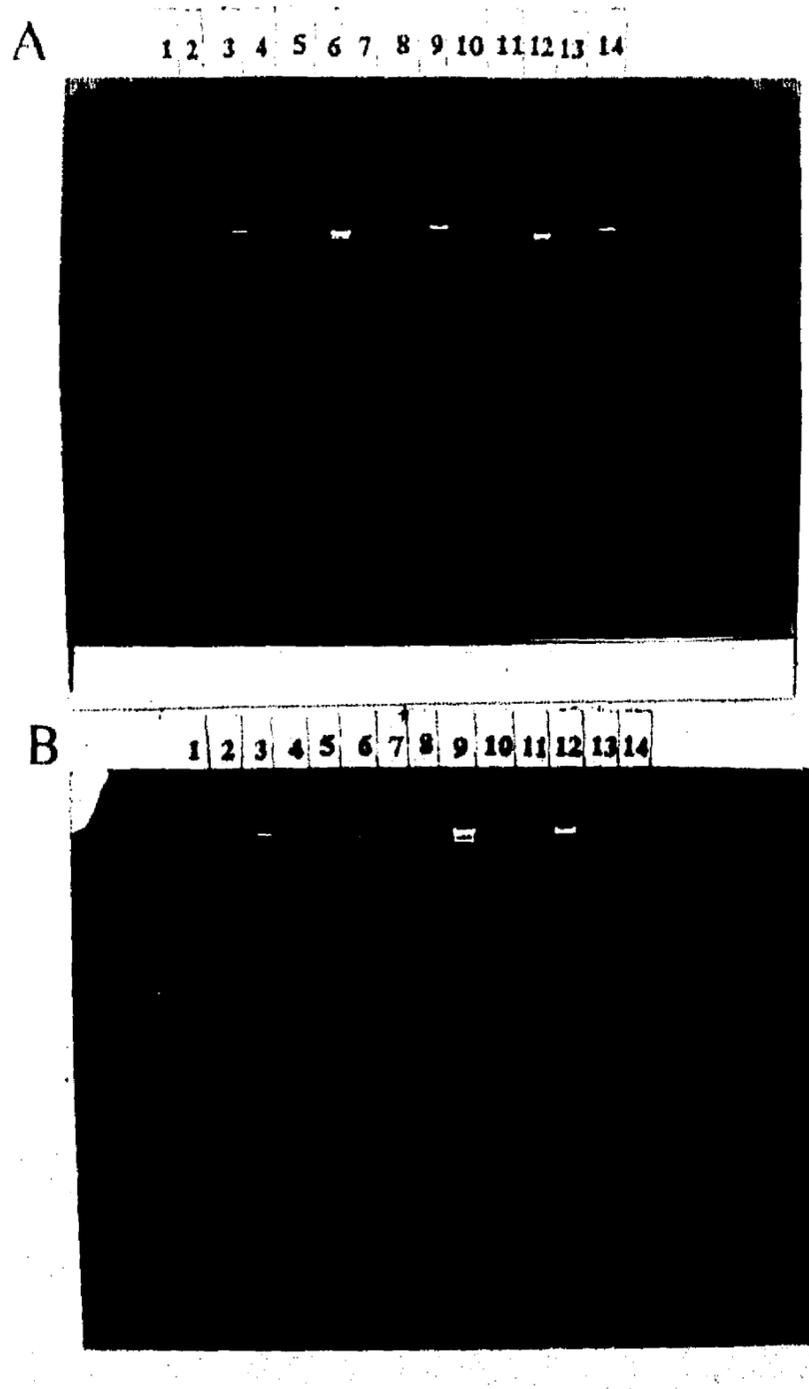


Figura 15A. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando TBE 1X como amortiguador.

Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de lambda gt 11, 3. ADN de CLA 7, 4. inserto de CLA 7, 5. ADN de lambda gt 11+Bam HI, 6. ADN de CLA 7+Bam HI, 7. inserto de CLA 7+Bam HI, 8. ADN de lambda gt 11+Hind III, 9. ADN de CLA 7+Hind III, 10. inserto de CLA 7+Hind III, 11. ADN de lambda gt 11+Pst I, 12. ADN de CLA 7+Pst I, 13. inserto de CLA 7+Pst I, 14. ADN de lambda +Hind III.

B. Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de lambda gt 11, 3. ADN de CLA 7, 4. inserto de CLA 7, 5. ADN de lambda gt 11+Pvu II, 6. ADN de CLA 7+Pvu II, 7. inserto de CLA 7+Pvu II, 8. ADN de lambda gt 11+Xho I, 9. ADN de CLA 7+Xho I, 10. inserto de CLA 7+Xho I, 11. ADN de lambda gt 11+Sst I, 12. ADN de CLA 7+Sst I, 13. inserto de CLA 7+Sst I, 14. ADN de lambda +Hind III.

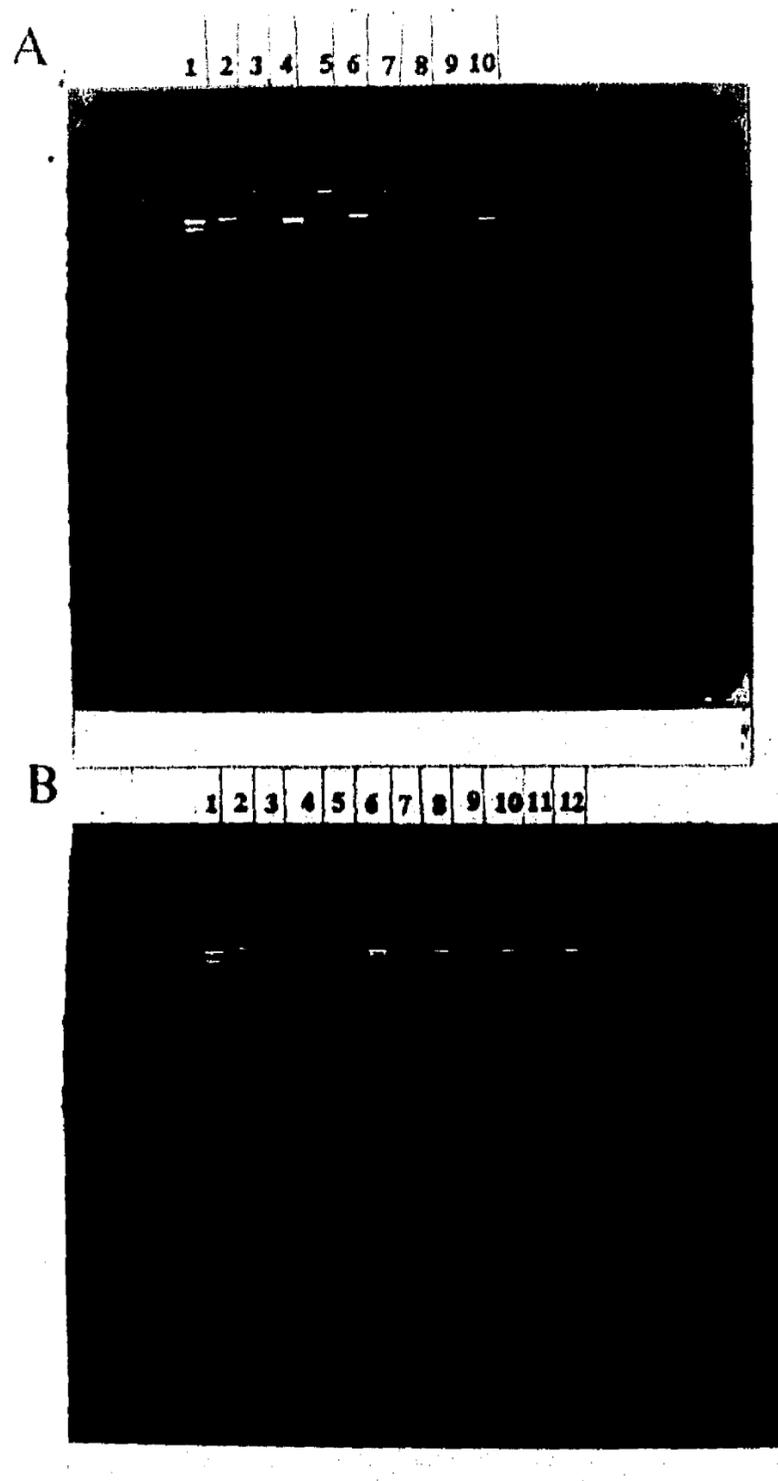


Figura 16A. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando TBE 1X como amortiguador.
Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de CLA 12, 3. inserto de CLA 12, 4. ADN de CLA 12+Bam HI, 5. inserto de la CLA 12+Bam HI, 6. ADN de CLA 12+Hind III, 7. inserto de CLA 12+Hind III, 8. ADN de CLA 12+Pst I, 9. inserto de CLA 12+Pst I, 10. ADN de lambda +Hind III.
B. Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de CLA 12, 3. inserto de CLA 12, 4. ADN de CLA 12+Pvu II, 5. inserto de CLA 12+Pvu II, 6. ADN de CLA 12+Xho I, 7. inserto de CLA 12+Xho I, 8. ADN de CLA 12+Sst I, 9. inserto de CLA 12+Sst I, 10. ADN de CLA 12+Eco RI, 11. inserto de CLA 12+Eco RI, 12. ADN de lambda +Hind III.

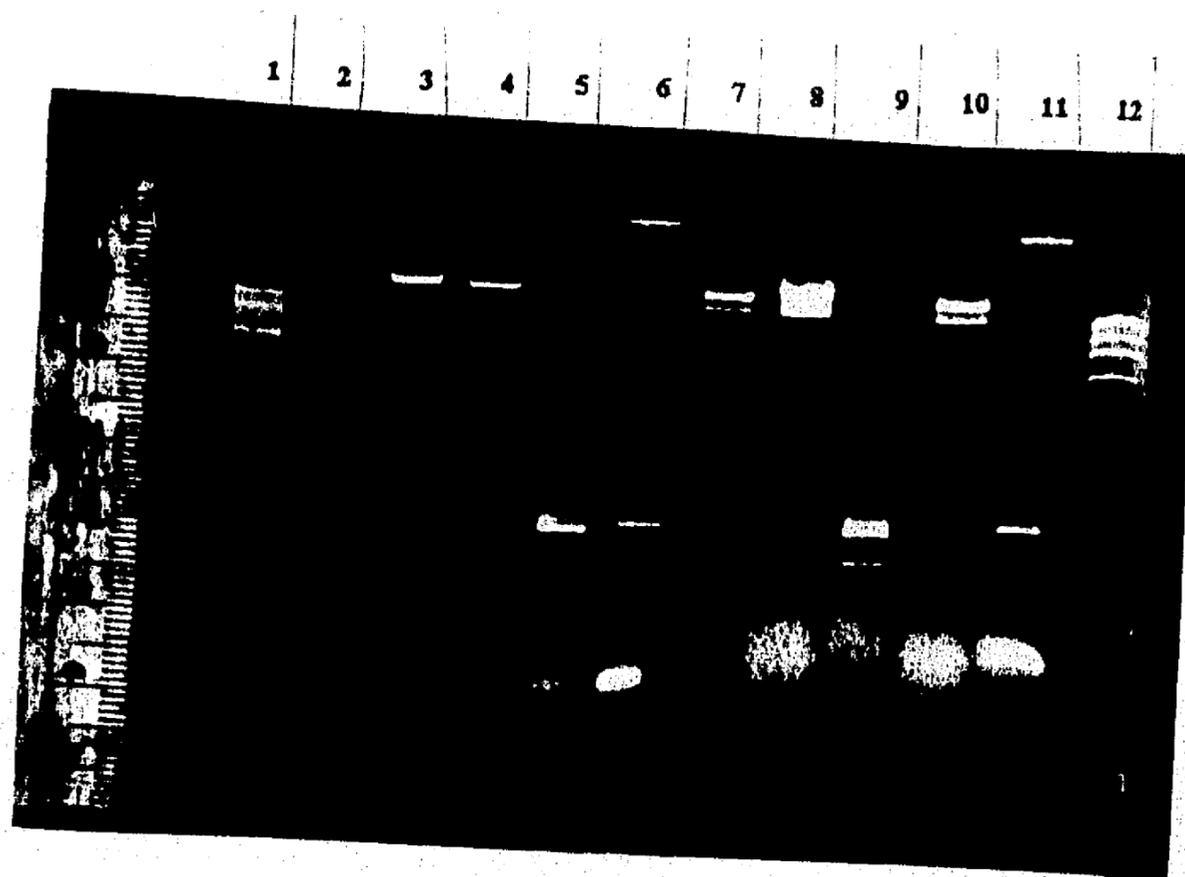


Figura 17. Electroforesis en agarosa 0.8 % usando TBE 1X como amortiguador.
Carriles: 1. ADN de lambda+Hind III, 2. ADN de lambda gt 11 silvestre, 3. ADN de CLA 7, 4. ADN de CLA 12, 5. inserto de CLA 7, 6. inserto de CLA 12, 7. ADN de lambda gt11 silvestre +Sal I, 8. ADN de CLA 7+Sal I, 9. inserto de CLA 7+Sal I, 10. ADN de CLA 12+Sal I, 11. inserto de CLA 12+Sal I, 12. ADN lambda+Hind III.

IV.9 Secuenciación de las clonas

El análisis de la secuencia de las clonas 6, 7, 8, 11, 12 y 13 se realizó usando el programa Fasta con los datos del Banco de genes (GenBank) (figura 18). Se encontró que las clonas 6, 7 y 8 contenían el 60.3 % de la secuencia del ARNr 18S de la subunidad menor de ribosomas de eucariontes con una identidad de 95.2 % (figura 19).

Clona 6

gcgctattgacacaacacggaaactaccaagaccgaacagtagaaggaatga
 cagattaagagtccttcatgattaltgggtagtgggcatggccg!cttagtgggg
 aglgatttgcaggtaattccggtaacgaacgagactgaaacctattaattagtttc
 tgctataagacagaaatgttcgcaagaacagggtcgtaagtaccacttctaaa
 gggacacattcaattgcctattttaattgtagtatacctaa!lccggttagacctctttaa
 cgtgggaaaaagaaaaagaaaaccc

Clona 7

gaattcgggictatcaatcagttggtagtalcgaggactaccaagattataacggat
 aacgaggaattggggctcagatcggagagggagcttacagatggctaccactt
 cttaggaaggcagcaggcgcgaaattaccacttctgaattgaagaggtagtga
 ccgacacataactctagaattgagtaaaatcaattctgaaggaatgagtaggag
 gtaaatctctacgaatcaattgagggcaagtctgggtagcagcagccgcgtaattcc
 agctccaattagtgatattaagtgtctgtgattaaacgctcgtagttgaattaaattgt
 tatacatt

Clona 8

gggattatgctgatgtaagattaagccatgcatgtaagtataaagaccaa
 gtaggatgaaactcgggacggctcactataacagtaatagttcttggtagtaa
 atacaaggatagcttggatgataaagataaacttgagacgatcagttgtatta
 gtacaaaatggccaattcattcaatgaattgagaaatgacttctaactcagtagga
 tgccacgacaattgta

Clona 11

taattgacacaacacggaaactaccaagcctaacaagtagaaggaatgacag
 taagagttcttcatgattaltgggtagtgggcatggccg!cttagtggggagtg
 attgtcaggtaattccggctcgaacgagactgaaacctattaattagttctgaaac
 ctattaattagtttctgcctataagacagaaatgttcgcaagaacagggtcgtaagt
 accacttctaaaggacacattcaattgcctattttaattgtagtatacctaa!lccggt
 tagacctctttaaactggtgggaaaaagaaaaagaaaaccc

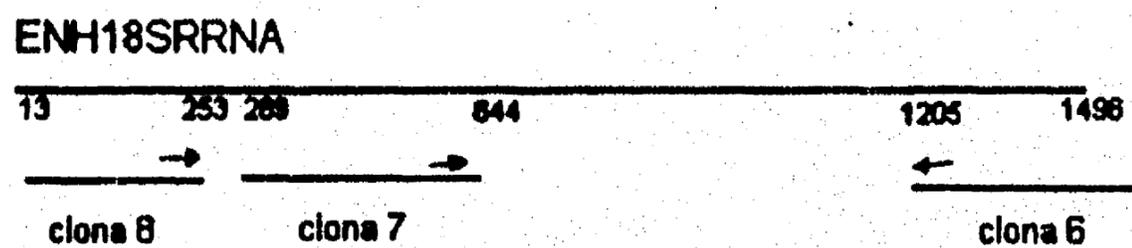
Clona 12

gatgcagtgaacaagctaagaaagaagttcttcttagagaagaactaaacc
 agaagatattcatggattcttggctgaaggatatttaacctgcagaggaggcaa
 aaaacatcacacgcagctgctgctagaggatgggtaaacctatggtttcagg
 agctgaaggaattaaagttgatgttctaaagaaatgclaaagattggaagccttg
 aagttcatgaaggagatatttaactattgatggatcactcggatggtctataaggg
 agaagttcattgagaagaaccacaagttggatcaggatattcggaaacctctaa
 aatgggccaatgaaatfaaaagattggagttttgccaatgcagatcttccatcag
 ctgctaagaaagccctgaattggagctgaaggattggactttgcagaactgaa
 cgtatgtcaatgcagtgaagctccaatggtgcaagtgattcttcaaatccctt
 gaagaaagaagaaatatttaactatgaaactatgccactcaaaaacaagattcat
 tggattattgaagactatgaatggacttccagtcactgtcagacttctgatccacca
 ttacatgaattc

Clona 13

aatgtcagtatgaattgcttaagcgcgggtaacggcggagtaactatgactctt
 aaggtagccaaatgcctcgtcatctaattagtgagictcaigatggatcaccgtg
 attcccactgtcctatcgcactatgtagaaaccacagtcagggaacgggcttg
 attggaacggcgggaaagaagacctgttagcttacttaattatcatgtga
 aatcgatttttggtataggctaggtgggagactttgtcaaacgtgtaataccaccac
 tagaaatactattcaccac

Figura 18. Secuencias de nucleótidos de las clonas 6, 7, 8, 11, 12 y 13.



60.3% de la secuencia con 95.2% de identidad

Figura 19. Secuencias del ARNr 18S de la subunidad menor de *Entamoeba histolytica* HM:1 IMSS.

Por otro lado se encontró que el inserto de la clona 12 codificaba para una porción de la enzima piruvato, ortofosfato dicinasa (PPDK). El análisis de homología de esta clona mostró una identidad de 58.5 % (644 nucleótidos), 56.2 % (625 nucleótidos) y 54.9 % (627 nucleótidos), con la PPDK de *Flavia trinervia*, de *Bacteroides symbiosus* y maíz, respectivamente. En el análisis de uno de las 6 marcos de lectura se encontró que codificaba para una secuencia de 184 aminoácidos, que al ser comparada con el banco de datos NBRF/ PIR usando el programa Fasta mostró una identidad de 49.4 % (178 aminoácidos), 48.9 % (180 aminoácidos) y 48.6 % (179 aminoácidos) con maíz, *B. symbiosus* y *F. trinervia*, respectivamente. Estas secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondieron aproximadamente al 20 % de la secuencia del gen o la proteína completa. La secuencia de 552 nucleótidos y su posición relativa a la secuencia reportada para maíz, *B. symbiosus* y *F. trinervia* se muestra en la figura 20, (Saavedra, et. al., 1992).

aggtatttaacctgcagaggaggcaaaaaacatcacacgcagctgctgctagagggtatgggtaaacatgtgttc
 aggagctgaaggaattaagttgatgttgctaagaaaattgctaagattggaagccttgaagttcatgaaggagatattt
 aactattgatggatcaactggatgtgtctataagggagaagttccattagaagaccacaagttggatcaggatattcgg
 aacctcttaaaatgggccaatgaaattaaaaagattggagttttgccaatgcagatcttccatcagctgctaagaaagc
 ccttgaatttggagctgaaggtattggactttgcagaactgaacgtatgttcaatgcagttgaagcttccaattgtgtcag
 tgattcttcaaatcccttgaagaaagaagaatacttaetgaactatgccacttcaaaacaagattcattggattt
 gaagactatgaatggacttccagtcactgtcagactcttcatccaccattacatgaattc

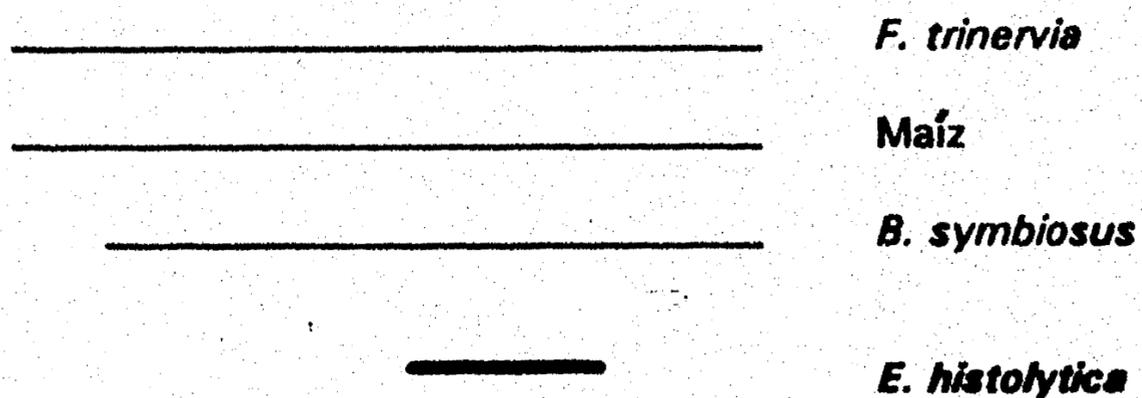


Figura 20. Secuencia y posición relativa del fragmento de la PPK a la secuencia reportada para maíz, *B. symbiosus* y *F. trinervia*.

V. DISCUSION

La intención de utilizar en este proyecto una biblioteca de ADNc en el bacteriófago lambda gt 11, que permitiera la expresión de la información genética, fue por un lado poder aprovechar los anticuerpos antiproteinasa que ya teníamos en el laboratorio para rastrear la o las clonas de *E. histolytica* que codificaran para la proteinasa y por el otro tener una sonda de ADN que codificara para una región de la proteinasa de membrana, que sirviera de prueba confirmatoria de que las clonas seleccionadas por los anticuerpos eran clonas que contenían información genética para la proteinasa.

Nuestros resultados fueron consistentes con el aislamiento de clonas reconocidas por anticuerpos antiproteinasa (figura 8) y con la hibridación de una de las clonas (CLA 13) con la sonda dirigida hacia el gen que codifica el extremo amino de la proteinasa (figura 9). La hibridación en punto (dot blot) del ADN de las clonas seleccionadas confirmó la presencia de secuencias complementarias a la sonda de ADN como lo muestra la figura 10.

Tratando de caracterizar el inserto que codificaba para la proteinasa, se purificó el ADN de tres clonas (CLP 13.6, CLP 13.7 y CLP 13.3), los cuales se sometieron a electroforesis. Las 3 clonas tuvieron un comportamiento distinto, lo cual aparentemente fue contradictorio, ya que habían sido seleccionadas con la misma sonda. Esto lo explicamos pensando que se trataba de clonas portadoras de insertos de distinto tamaño (figura 11A). Cuando la hibridación se realizó directamente en el gel usando la sonda biotinilada, en los carriles correspondientes se observó un barrido en lugar de bandas definidas (figura 11B). Tratando de extraer el inserto de las clonas, el ADN se sometió a digestión con *Eco* RI y *Bam* HI (figura 12A), y no se observó con claridad la escisión del inserto. En la autorradiografía correspondiente se encontró una banda de 3.2 Kb en el carril que contenía el ADN de la clona 13 digerida con *Eco* RI, una banda de 4.2 kb el ADN de la clona 13 digerida con *Bam* HI y una banda de 5.5 kb en el ADN de la clona CLP 13.6 digerida con *Eco* RI (figura 12B).

La electroforesis de los ADNs de las clonas seleccionadas con anticuerpos, sin digerir mostró patrones de migración muy similares (CLA 5, CLA 6, CLA 7, CLA 8, CLA 9, CLA 11, CLA 12, CLA 13 y CLA 14). En este gel también se incluyó ADN del bacteriófago lambda gt 11

silvestre, ADN de *Escherichia coli* Y1088 y Y1090, ADN de *E. histolytica*, y ARNm total como controles (figura 13). El Southern blot correspondiente a este gel se hibridó con la sonda biotinilada y se observaron bandas claras de hibridación en los carriles correspondientes a las clonas. Sin embargo, llama la atención que los carriles que contenían ADN del bacteriófago lambda cortado con *Hind* III, ADN de lambda gt 11 silvestre y ADN de *E. coli* Y1088 también reaccionaron con la sonda biotinilada. Por otro lado los carriles correspondientes al ADN de *E. histolytica* y al ARNm total no mostraron bandas de hibridación (figura 14). De las clonas del experimento anterior se seleccionaron 3 (CLA 7, CLA 9 y CLA 12) que fueron tratadas con *Bam* HI. Asimismo se incluyeron como controles ADN de *E. histolytica* y ADN del bacteriófago lambda gt11 silvestre, los cuales también se digirieron con *Bam* HI. En este caso las clonas también mostraron patrones de restricción muy similares consistiendo de 2 bandas principales y otra de menor intensidad. Una de las bandas principales tiene un tamaño de 23.1 kb y la otra de 6.5 kb, mientras la banda de menor intensidad mostró un tamaño de 10 kb. La hibridación del Southern blot correspondiente a este gel con la sonda biotinilada mostró bandas prácticamente en todos los carriles incluyendo los controles.

Para aclarar esta confusión decidimos secuenciar algunos de los insertos de las clonas seleccionadas, encontrando que tres de las clonas (CLA 6, 7 y 8) tenían homología con el ARNr 18S de la subunidad menor de los ribosomas eucarióticos. Es importante recalcar que hasta la fecha son las únicas secuencias nucleotídicas reportadas para ARNr de *E. histolytica* HM1: IMSS, ya que los que se han secuenciado corresponden a otras cepas de *E. histolytica* (Que and Reed, 1991). La secuencia parcial de otra clona (CLA 12) mostró homología con las PPK de maíz (Matzuoka, et. al., 1988), de *F. trinervia* (Roshe, et. al., 1990) y con *B. symbiosus* (Pocalyko, et. al., 1990). Estos resultados obtenidos de las secuencias fueron totalmente inesperados. Lo que nosotros esperábamos era obtener secuencias homólogas a la porción de la proteína de membrana secuenciada parcialmente (Luaces and Barrett, 1988) o bien alguna secuencia correspondiente a las otras proteínas de cisteína solubles de *E. histolytica*, ya que se ha observado que las proteínas de cisteína tienen regiones conservadas (Eakin, et. al., 1990).

Buscando una explicación a los resultados anteriores, nos planteamos que probablemente la tabla de uso de codones que usamos para diseñar la sonda no era representativa, ya que fue obtenida de los 2

genes de *E. histolytica* que se habían secuenciado hasta 1989 (Edman, et. al., 1987; Huber, et. al., 1987; Huber et. al., 1988). Aun sin embargo, comparando nuestra tabla de uso de codones con las tablas elaboradas con un número mayor de codones (4455 codones, Char and Farthing, 1992; 4680 codones, Tannich and Horstmann, 1992), no encontramos diferencias importantes, que nos pudieran explicar los resultados obtenidos.

Al hacer una comparación de la secuencia amino terminal de la proteinasa que usamos como base para diseñar la sonda (Luaces and Barrett, 1988) con la secuencia reportada posteriormente (Tannich, et. al., 1991) encontramos una diferencia en tres aminoácidos y seis aminoácidos que no identificaron Luaces y Barrett, haciendo un total de nueve aminoácidos. Esto quiere decir, que desde el inicio solo teníamos correcto el 50 % de la secuencia de la sonda.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 2 | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0 |
| I | X | P | E | S | V | D | X | R | Q | X | G | X | V | T | P | Y | X | X | Q | G |
| II | A | P | K | A | V | D | W | R | K | K | G | K | V | T | P | Y | R | D | Q | G |

Figura 21. Comparación de la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la histolisina de Luaces and Barrett, 1988 (Y) y la proteinasa de Tannich, et. al., 1991.

Por otro lado, al comparar la secuencia de nucleótidos de nuestra sonda correspondiente al 50 % de aminoácidos que si coincidían, con la secuencia de nucleótidos reportada por Tannich, et. al., en 1991, encontramos diferencia en el uso de codones, en los cuáles *E. histolytica* no usó los que predecía la tabla, sino que uso otros que son menos representativos, lo que redujo de manera drástica la especificidad de nuestra sonda, (figura 22).

| | 2 | 5 | 6 | 8 | 10 | 11 | 3 | 4 | 5 | 9 | 20 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| I | P | V | D | R | G | V | T | P | Q | G | |
| II | CCA | GTT | GAT | AGA | GGA | GTT | ACT | CCA | CAA | GGA | |
| III | GGT | CAA | CTA | TCT | CCT | CAA | TGA | GGT | GTT | CCT | |
| IV | CCC | GTA | GAT | AGA | GGG | GTA | ACA | CCA | CAA | GGG | |

Figura 22. Comparación de la secuencia de nucleótidos entre la sonda y el gen de la proteinasa. I. Aminoácidos que coinciden entre la histolisina y la proteinasa, II y III secuencia de la sonda sintética y IV. Secuencia de nucleótidos del gen de la proteinasa.

Aun así, no tenemos una explicación a las señales positivas de hibridación de las distintas clonas seleccionadas.

VI. CONCLUSIONES

Creemos que los resultados obtenidos son importantes, ya que las secuencias de las clonas 6, 7 y 8 que codifican para el 60.3 % del ARNr 18S de la subunidad menor de los ribosomas eucarióticos, eran las únicas secuencias ribosomales reportadas hasta 1992 para *E. histolytica* HM1: IMSS, ya que las existentes en la literatura correspondían a otras cepas de *E. histolytica*. El hallazgo de una clona que codificaba para una porción de la PPDK, también fue sorprendente, ya que esta enzima sólo se había descrito en plantas y en algunas bacterias en lugar de la piruvato cinasa, y no se conocía su presencia en parásitos del tipo de *E. histolytica*, (Saavedra, et. al., 1992). Esta información viene por un lado a aclarar parte del metabolismo energético de esta amiba y por otro lado abre la posibilidad de encaminar estrategias terapéuticas hacia la inhibición de esta enzima ya que no se encuentra en la vía glucolítica de células eucarióticas, por lo que sería un tratamiento muy específico.

Haciendo una revisión retrospectiva de nuestro planteamiento para abordar este problema, creemos que fue válido y sigue siendo vigente, ya que casi simultáneamente otro grupo en Alemania también abordó el mismo problema siguiendo una estrategia inicial similar a la nuestra, es decir realizar un tamizaje inicial de la biblioteca de expresión usando anticuerpos, y pudo clonar y secuenciar el gen que codifica para la proteinasa antes mencionada, (Tannich, et. al., 1991).

Reflexionando sobre el diseño de la sonda, encontramos deficiencias. Primero, en la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteinasa, ya que no era la más correcta. Segundo, en el uso de nucleótidos que propusimos para *E. histolytica*, no fue el más adecuado, ya que esta no siempre utiliza los codones más representativos. Tercero, la sonda era relativamente muy grande (60 nucleótidos), cabiendo la posibilidad de que presentara regiones de estructura secundaria, disminuyendo así las posibilidades de hibridación específica, (figura 21). La experiencia anterior nos dejó varias enseñanzas:

1. Estar 100 % seguros de la secuencia de aminoácidos hacia la cual va a estar dirigida la sonda.
2. De ser posible seleccionar secuencias de aminoácidos conservadas.
3. Sintetizar mezclas de oligonucleótidos de menor tamaño (10-15 nucleótidos), utilizando todas las posibles combinaciones de uso de codones del organismo en cuestión.

4. Verificar tan pronto como sea posible aquellas clonas que mostraron señales positivas, a través de la secuenciación.

5. Este trabajo sirvió como base para desarrollar la metodología de biología molecular en el laboratorio del Dr. Pérez-Montfort, como una estrategia de punta para el análisis molecular de distintas proteínas.

Finalmente, no se cumplió con el objetivo original de clonar el gen que codificaba para la proteinasa de bajo peso molecular, ni ninguna otra proteinasa de cisteína, a pesar de que al contrastar la sonda sintética en el banco de información GeneBank, se encontró que tenía cierto grado de homología con algunas proteinasas de cisteína. En esta comparación, también observamos que no muestra ninguna homología con las secuencias de ARNr.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Albach, R. A. Booden, T. and Boonlayangoor, P. 1977. *Entamoeba histolytica*: autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. *Exp. Parasitol.* **42**: 248-259.
- Albach, R. A., Booden, T., Boonlayangoor, P., and Drowing, S. 1980. Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Méd. (México)* **11**: Supl. 1, 63-74.
- Albach, R. A., Prachayasittikul, V., and Heebner, G. 1984. Isolation and characterization of RNA from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **12**: 261-271.
- Albach, R. A. 1989. Nucleic Acids of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **36(2)**: 197-205.
- Allason-Jones, E., Mindel, A., Sargeant, P. and Williams, P. 1986. *Entamoeba histolytica* as a comensal intestinal parasite in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* **315**: 353-356.
- Andrews, B. J., Mentzoni, L. and Bjorvatn, B. 1990. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **84**: 63-65.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. and Struhl, K. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley, New York.
- Balamuth, W. 1946. Improved egg yolk infusion for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. *Am. J. Clin. Pathol.* **16**: 380-384.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., and Diamond, L.S. 1988. Comparison of repeated DNA from strains of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**: 257-262.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, L., and Soldo, A. T. 1989. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool.* **36(5)**: 455-458.
- Bhattacharya, S. Bhattacharya, A., and Diamond, L. 1992. *Entamoeba histolytica* extrachromosomal circular ribosomal DNA: analysis of clonal variation in a hypervariable region. *Exp. Parasitol.* **74**: 200-204.
- Biagi, F. and Portilla, J. 1957. Comparison of methods of examining stools for parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **6**: 906-911.

- Boeck, W. C., and Drbohlav, J. 1925. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.* **5**: 371-407.
- Brocklehurst, K., Carlsson, J., Kierstan, M. P. J. and Crook, E. M. 1974. Covalent chromatography by thiol-disulfide interchange. *Meth. Enzymol.* **34 B**: 531-544.
- Bruckner, D. A. 1992. Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **5(4)**: 356-369.
- Brumpt, E. 1925. Etude sommaire de l'"*Entamoeba dispar*" n. sp., amibe à kystes quadrinuclées, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med. (Paris)* **94**: 942-952.
- Burch, D. J., Li, E., Reed, S., Jackson, T. F. H. G. and Stanley, S. L. Jr. 1991. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J. Clin. Microbiol.* **29(4)**: 696-701.
- Byers, T. 1986. Molecular biology of DNA in *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba* and *Naegleria*. *Intl. Rev. Cytol.* **99**: 311-341.
- Calderon, J. and Tovar, R. 1986. Loss of susceptibility to complement lysis in *Entamoeba histolytica* HM1 by treatment with human serum. *Immunology* **58**: 467-471.
- Cazares, F., Manning-Cela, R., and Meza, I. 1994. Heterogeneity of the ribosomal DNA episome in strains and species of *Entamoeba*. *Mol. Microbiol.* **12**: 607-612.
- Cevallos, M. A., Porta, H., Alagón, A. C. and Lizardi, P. M. 1993. Sequence of the 5.8S ribosomal gene of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Nucl. Ac. Res.* **21(2)**: 355
- Char, S. and Farthing, M. J. G. 1992. Codon usage in *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* **22(3)**: 381-383.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E. MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 5294-5299
- Clark, C. G. and Diamond, L. S. 1991a. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 11-18.

- Clark, C. G. and Diamond, L. S. 1991b. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "nonpathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 297-302.
- Cohen, L. W., Coghlan, V. M. and Curtis Dihel, L. 1986. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene* **48**: 219-227.
- Councilman, W. T., and LaFleur, H.A. 1891. Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp. Rep.* **2**: 395-548.
- Cruz-Hernández de la, F., Ocádiz, J. R. and Orozco, E. 1986. Análisis de la organización del DNA de varias cepas y clonas de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (Méx.)*. **17(1)**: 107-112.
- Cruz-Reyes, J. A., Spice, W. M., Rehman, T., Gisborne, E. and Ackers, J. P. 1992. Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.* **104**: 239-246.
- Davis, L. G. Dibner, M. D. and Battey, J. F. 1986. Basic methods in molecular biology. Ellsevier Science Publishing Co., Inc.
- Diamond, L. S. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Science* **134**: 336-337.
- Dobell, C. 1928. Research on the intestinal protozoa of monkeys and man. *Parasitology* **20**: 357-412.
- Eakin, A. E., Bouvier, J., Sakanari, J. A. C. S. and McKerrow, H. 1990. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 1-8.
- Edman, U., Meza, I. and Agabian, N. 1987. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **84**: 3024-3028.
- Ehrenberg, L., Fedorcsak, I., and Solymosy, F. 1976. Diethylpyrocarbonate in nucleic acid research. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **16**: 189-
- Garfinkel, L. I., Giladi, M., Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., and Rozenblatt, S. 1989. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non-pathogenic zymodemes. *Infec. Immun.* **57**: 926-931.

- Gelderman, A. H., Keister, D. B., Bartgis, L. and Diamond, L. S. 1971a. Characterization of the deoxyribonucleic acid of representative strains of *Entamoeba histolytica*, *E. histolytica*-like amebae, and *E. Moshkovskii*. *J. Parasitol.* **57(4)**: 906-911.
- Gelderman, A. H., Bartgis, I. L., Keister, D. B. and Diamond, L. S. 1971b. A comparison of genome sizes and thermal denaturation-derived base composition of DNAs from several members of *Entamoeba* (histolytica group). *J. Parasitol.* **57(4)**: 912-916.
- Gontijo, N. F., Ribeiro, J. C. C. and Pena, S. D. J. 1990. Direct hybridization of biotin-labeled probes in dried agarose gels: application to DNA fingerprinting. *Focus* **12(2)**: 55-57.
- Grodberg, J., Salazar, N., Oren, N., and Mirelman, D. 1990. Autonomous replication sequences in an extrachromosomal element of a pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Nucl. Acid. Res.* **18(18)**: 5515.
- Gubler, U. and Hoffman, B. J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269.
- Guerrant, R. L. 1986. Amebiasis: introduction, current status and research questions. *Rev. Dis.* **8**: 218-227.
- Horstmann, R. D., Leippe, M. and Tannich, E. 1992. Recent progress in the molecular biology of *Entamoeba histolytica*. *Trop. Med. Parasitol.* **43**: 213-218.
- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. 1987. *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**: 227-235.
- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. 1988. Nucleotide sequence analysis of an *Entamoeba histolytica* ferredoxin gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**: 27-34.
- Huber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, S., Rozenblatt, S., and Garfinkel, L. 1989. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**: 285-296.
- Jones, W.R. 1946. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica* with a method for evaluating the antiamebic properties of new compounds. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **40**: 130-140.

- Kahn, F.H., and Visscher, B. R.. 1975. Water disinfection in the wilderness- a simple effective method of iodination. *West. J. Med.* **122**: 450-453.
- Kean, B. H., Mott, K.E., and Russell, A.J. 1978. *Tropical medicine and parasitology*, vol. I, p. 71-168. Clsics Investigations, Cornell University Press, Ithaca, N.Y.
- Kusamrarn, T., Vinijchaikul, K., and Bailey, G. B. 1975. Comparison of the structure and function of polisomal and helicoidal ribosomes from *Entamoeba invadens*. *J. Cell. Biol.* **65**: 540-548.
- León de, A. 1970. Pronóstico tardío en el absceso hepático amibiano. *Arch. Inv. Méd.* **1**: 205-206.
- Leyva-Leyva, M., Hidalgo, M. E., and Orozco, E. 1986. Aislamiento, caracterización y traducción in vitro de RNA de clonas de *Entamoeba histolytica* deficientes en adhesión. *Arch. Inv. Méd. (Méx)*. **17(Supl. 1)**: 155-159.
- Lockett, J. T. 1990. A bacteriophage lambda DNA purification procedure suitable for the analysis of DNA from either large or multiple small lysates. *Anal. Biochem.* **185**: 230-234.
- Long, E. O., and Dawid, I. B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 727-764.
- Lopez-Revilla, R. and Gomez, R. 1978. *Entamoeba histolytica*, *E. invadens* and *E. moshkovskii*: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* **44**: 243-248.
- Lopez-Revilla, R. and Gomez, R. 1988. Trophozoite and nuclear size, DNA base composition, and nucleotide sequence homology of several *Entamoeba* strains in axenic culture. *Parasitol. Res.* **74**: 424-430.
- Luaces, A. L. and Barrett, A. J. 1988. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* **250**: 903-909.
- Mackenstedt, U., Schmith, M., Raether, W., Melhorn, H., and Uphoff, M. 1990. Increase in DNA content in tissue stages of *Entamoeba histolytica* strain SFL3. *Parasitol Res.* **76**: 373-378.
- Mandel, M. and Higa, A. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 154-162.
- Maniatis, T., Fritsch, E. E, and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y. p. 112-113.

- Mann, B. J., Torian, B. E., Vedvick, T. S. and Petri, W. A. Jr. 1991. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **88**: 3248-3252.
- Markell, E.K., Voge, M., and John, D.T. 1986. Medical Parasitology. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Markwell, M. A. K. 1982. A new solid-state reagents to iodinate proteins. 1. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal. Biochem.* **125**: 427-432.
- Marquez-Monter, H., Becker, I. and Carrillo-Farga, J. 1990. Mitosis and polykaryon formation of *Entamoeba histolytica* in axenic cultures. *Arch. Inv. Med (Mex).* **21 (Suppl.1)**: 69-73.
- Martínez-Palomo, A. (1982). Biology of *Entamoeba histolytica*. In Amebiasis. Chichester: Research Studies Press-Wiley.
- Martínez-Palomo, A. (1986). Biology of *Entamoeba histolytica*. In Amebiasis. Vol.2 Human Parasitic Diseases. Martínez-Palomo, A. (de). Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, pp. 11-43.
- Matsuoka, M., Ozeki, Y., Yamamoto, N., Hirano, H., Kano-Murakami, Y. and Tanaka, Y. 1988. Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Mol.* **263**: 11080-11083.
- Meester de, F., Bracha, R., Huber, M., Keren, Z., Rozenblatt, S. and Mirelman, D. 1991. Cloning and characterization of an unusual elongation factor-1alpha cDNA from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **44**: 23-32.
- Mendoza, F., Arcos, L., Ortiz-Ortiz, L., and Díaz de León, L. 1982. Protein biosynthesis by *Entamoeba histolytica* in culture. *Arch. Inv. Méd.* **13(Supl. 3)**: 71-76.
- Miller, H. 1987. Practical aspects of preparing phage and plasmid DNA: growth, maintenance, and storage of bacteria and bacteriophage. Guide to molecular cloning techniques. *Meth. Enz.* (Berger, S. L. and Kimmel, A. R. eds.) **152**: 145-170.
- Mirelman, D., Bracha, R., Chayen, A., Aust-Kettis, A. and Diamond, L. S. 1986a. *Entamoeba histolytica*: effects of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Exp. Parasitol.* **62**: 142- 148.
- Mirelman, D., Bracha, , R., Wexler, A. and Chayen, A. 1986b. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infect. Immun.* **54**: 827-832.

- Mirelman, D., Bracha, R., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. I. 1990. Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction in a cloned nonpathogenic strain. *Infect. Immun.* **58**: 1660-1663.
- Mittal, V., Ramachandran, S., Sehgal, D., Bhattacharya, A., and Bhattacharya, S. 1991. Sequence analysis of a DNA fragment with yeast autonomously replicating sequence activity from the extrachromosomal ribosomal DNA circle of *Entamoeba histolytica*. *Nucl. Acids Res.* **19(10)**: 2777.
- Muñoz, M. L., Rojkind, M., Calderon, J. Tanimoto, M., Arias-Negrete, S. and Martínez-Palomo, A. 1984. *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. *J. protozool.* **31**: 468-470.
- Pan, C. T., and Geiman, Q. M. 1955. Comparative studies of intestinal amebae. 1. Distribution and cyclic changes of the nucleic acids in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Am. J. Hyg.* **62**: 66-79.
- Perez-Mutul, J. Cázares, F., and Meza, I. 1986. Isolation and initial characterization of DNA from *Entamoeba histolytica* HM 1: IMSS. *Arch. Inv. Méd. (México)*, **17(Supl. 1)**: 113-119.
- Petri, W. A. Jr. 1990. International seminar on amoebiasis. *Parasitology Today* **6(3)**: 62-63.
- Pocalyko, D. J., Carroll, L. J., Martin, B. M., Babbitt, P. C. and Dunaway-Mariano, D. 1990. Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochem.* **29**: 10757-10765.
- Prachayasittikul, V. and Albach, R. A. 1982. RNA depolymerase in *Entamoeba histolytica*: soluble vs. ribosomal. *Arch. Inv. Méd.* **13(Supl. 3)**: 29-35.
- Que, X. and Reed, S. L. Nucleotide sequence of a small subunit ribosomal RNA (16S- like rRNA from *Entamoeba histolytica*: differentiation of pathogenic from nonpathogenic isolates. *Nucl. Ac. Res.* **19(19)**: 5438.
- Ramachandran, S., Bhattacharya, A. and Bhattacharya, S. 1993. Nucleotide sequence analysis of the rRNA transcription unit of a pathogenic *Entamoeba histolytica* strain HM 1: IMSS. *Nucl. Ac. Res.* **21(8)**: 2011.

- Raué, H. A., Klootwijk, J. and Musters, W. 1988. Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**: 77-129.
- Reed, S. L. 1992. Amebiasis: An Update. *Clin. Inf. Dis.* **14**: 385-393.
- Reeves, R. E., Lushbaugh, T. S. and Montalvo, F. 1971. Characterization of deoxyribonucleic acid of *Entamoeba histolytica* by cesium chloride density centrifugation. *J. Parasitol.* **57**(5): 939-944.
- Robinson, G.L. 1968. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebas. *Trans. R. Soc. Trop. med. Hyg.* **62**: 285-294.
- Rosche, E. and Westhoff, P. 1990. Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C₄ plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Letters.* **273**: 116-121.
- Saavedra-Lira, E., Robinson, O. and Perez-Montfort, R. 1992. Partial nucleotide sequence of the enzyme pyruvate, orthophosphate dikinase of *Entamoeba histolytica* HM1 : IMSS. *Arch. Med. Res.* **23** (2): 39-40.
- Samuelson, J., Acuña-Soto, R., Reed, S., Biagi, F., and Wirth, D. 1989. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 671-676.
- Samuelson, J., Ayala, P., Orozco, E. and Wirth, D. 1990. Emetine-resistant mutants of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNA for multidrug resistance. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**: 281-290.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5468.
- Sargeant, P. G., Williams, J. E., and Grene, J. D. 1978. The differentiation of invasive and non invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 519-521.
- Schnare, M. N., Cook, J. R. and Gray, M. W. 1990. Fourteen internal transcribed spacers in the circular ribosomal DNA of *Euglena gracilis*. *J. Mol. Biol.* **215**: 85-91.
- Sogin, M. L. 1989. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Amer. Zool.* **29**: 487-499.

- Solymosy, R., Lazar, G., and Bagi, G. 1970. An improved version of the diethylpyrocarbonate method for extracting ribosomal nucleic acids. *Anal. Biochem.* **38**: 40-45.
- Southern, E. M. 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stanley, S. L. Jr., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L. and Li, E. 1990. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 4976-4980.
- Stoner-Picking, J., Prachayasittikul, J., and Albach, R. A. (1986). High salt SDS-DEP isolation of RNA from *Entamoeba histolytica*: the recovery of intact 25 S RNA from amebae of different culture ages and coisolation of DNA. *Arch. Invest. Méd.* **17(Supl. 1)**: 121-125.
- Strachan, W. D., Spice, W. M., Chiodini, P. L., Moody, A. H., and Ackers, J. P. 1988. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* **i**: 561-562.
- Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J. and Arnold, H. H. 1989. Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 5118-5122.
- Tannich, E., Ebert, F. and Horstmann, R. D. 1991. Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **88**: 1849-1853.
- Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R. and Horstmann, R. D. 1991. Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **266**: 4798-4803.
- Tannich, E. and Burchard, G. E. 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.* **29(2)**: 250-255.
- Tannich, E. and Horstmann, R. D. 1992. Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Evol.* **34**: 272-273.
- Torian, B. E., Flores, B. M., Stroehel, V. L., Hagen, F. S. and Stamm, W. E. 1990. cDNA sequence analysis of a 29 kDa cysteine rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 6358-6362.

- Torres-Guerrero, H., Peattie, D. A., and Meza, I. 1991. Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 121-130.
- Torres, R. A., Ganal, M. and Hemleben, V. 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* **30**: 170-181.
- Vanik, J. M., Detke, S., and Albach, R. A. 1986. Partial characterization of DNA-dependent RNA polymerases from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Inv. Méd.* **17**(Supl. 1): 101-106.
- Wada, K., Wada, Y., Doi, H., Ishibashi, F., Gojobori, T. and Ikemura, T. 1991. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucl. Ac. Res.* **19**: 1981-1986.
- Walker, E. and Sellards, A. W. 1913. Experimental entamoebic dysentery. *Philipp. J. Sci.* **8**: 253-330.
- Walsh, J. A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Inf. Dis.* **8**: 228-238.
- Young, R. A. and Davis, R. W. 1983. Efficient isolation of genes by using antibodies probes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **80**: 1194-1198.
- Zurita, M., Alagón, A., Vargas-Villarreal, J., and Lizardi, P. 1991. The *Entamoeba histolytica* rDNA episome: nuclear localization, DNAase I sensitivity map, and specific DNA-proteins interactions. *Mol. microbiol.* **5**(8): 1843-1851.

Partial Nucleotide Sequence of the Enzyme Pyruvate, Orthophosphate Dikinase of *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS

E. Saavedra Lira, O. Robinson, and R. Pérez Montfort

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70242, 04510 México, DF.

Abstract

We isolated a clone from a lambda gt11 cDNA library of *E. histolytica*, subcloned its insert in the vector pTZ18R and sequenced it by the method of Sanger. Sequence comparison with Genbank and of the corresponding amino acid sequence with the NBRF/PIR data bank using the FastA program, showed homologies between 54.9 and

58.5% for the nucleotides and between 48.6 and 49.4% for the amino acids with pyruvate, orthophosphate dikinase from maize, *Flaveria trinervia* and *Bacteroides symbiosus*. The sequence obtained for *E. histolytica* represents about 20% of the complete gene or protein sequence.

KEY WORDS: Pyruvate, Orthophosphate dikinase, PPDK, Partial sequence, *E. histolytica*.

Introduction

Carbohydrate metabolism in the protozoan *E. histolytica* differs in some aspects from that of many "aerobic" organisms (1). In the glycolytic pathway the transformation of phosphoenolpyruvate to pyruvate is one of the two reactions of substrate phosphorylation in which there is ATP production. In most eukaryotic organisms, pyruvate kinase catalyzes this reaction by transferring the phosphate group of phosphoenolpyruvate to ADP, yielding ATP and pyruvate as products. There is no pyruvate kinase present in *E. histolytica* (1), but another enzyme dephosphorylates phosphoenolpyruvate. Soon after, Hatch and Slack described a new enzyme for the interconversion of pyruvate into phosphopyruvate in tropical grasses (2). Reeves reported the identification and partial purification of an enzyme in *E. histolytica* trophozoites, which catalyzes the formation of pyruvate from phosphoenolpyruvate in a reaction that is strictly dependent on inorganic pyrophosphate and in which there is a dependence on AMP as the substrate, instead of ADP (3). This enzyme received the trivial name, pyruvate, orthophosphate dikinase or pyruvate, phosphate dikinase (PPDK) (4). It catalyzes the following reaction:



Enzymes catalyzing the same reaction have been only described in certain plants and bacteria (2,4-7).

This work reports the identification of a nucleotide sequence from a complementary DNA (cDNA) library of *E. histolytica* which shows homology with the reported sequences for PPDK from maize, *Flaveria trinervia* and *Bacteroides symbiosus* (5-7).

Materials and Methods

cDNA library. The cDNA library of *E. histolytica* strain HM1:IMSS, prepared in lambda gt11, was a generous gift of Dr. Isaura Meza and

Dr. Marco Antonio Meraz (CINVESTAV, IPN México, D.F.). Its construction has been described previously (8).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification. The EcoRI-EcoRI insert was amplified in 25 cycles as follows: denaturation for 1 min at 94°C, alignment at 50°C for 3 min, and polymerization at 72°C for 1 min. We used nucleotides that were specific for lambda gt11 and which have restriction sites for the endonucleases SmaI and SmaI (a kind gift of Dr. Abraham Landa, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F.).

Subcloning in pTZ18R and sequencing. The insert was digested with SmaI and SmaI and ligated into pTZ18R (Pharmacia). The recombinant vector was used to transform *Escherichia coli* TG1 cells (9), from which single-stranded templates were purified and sequenced by the dideoxy chain-termination method of Sanger (10).

Results

A clone was isolated from a cDNA library of *E. histolytica* strain HM1:IMSS prepared in lambda gt11 whose insert was amplified by PCR, subcloned into pTZ18R and sequenced.

Homology searches of the sequence (635 nucleotides) were performed with the data bank Genbank (release 72.0) using the FastA program (11). The percentages of identity were 58.5, 56.2 and 54.9 over 644, 625 and 627 nucleotide overlaps with PPDK from *F. trinervia*, *B. symbiosus* and maize, respectively.

One of the six reading frames coded for a sequence of 184 amino acids and was compared with the NBRF/PIR data bank (release 30.0) also using the FastA program. The percentages of identity were 49.4, 48.9 and 48.6 over 178, 180 and 179 amino acid overlaps for maize, *B. symbiosus* and *F. trinervia*, respectively.

These sequences of nucleotides and amino acids correspond to approximately 20% of the complete gene or protein sequence. The sequence of 552 nucleotides and their relative position to the reported sequences for maize, *B. symbiosus* and *F. trinervia* is shown in Figure 1.

This work was supported in part by grant IN200289 from DGAPA/UNAM.

aggatatttaacctgcagaggaggcaaaaaacatcacacgcagctgicgttgctagaggtatgggttaaaccaatgigtctc
 aggagctgaaggaattaaagttgatgttgctaaagaaatgctaaagattggaagccttgaagttcatgaaggagatattt
 aactatgatggatcaactggatgigtctataagggagaagttccattagagaaccacaagttggatcaggatattcgg
 aaccatcttaaatgggccaatgaattaaaaagattggagttttgccaatgcagatctccatcagctgctaagaagc
 ccttgaattggagctgaaggtatggacttgcagaactgaacgtatgttcaatgcagttgaagcttcaattgtgtcag
 tgattcttcaaatcccttgaagaagaaagaaatacttactgaactatgccacttcaaaaacaagatttcattggattt
 gaagactatgaatggacttccagtcactgicagacttctgatccaccattacalgaattc

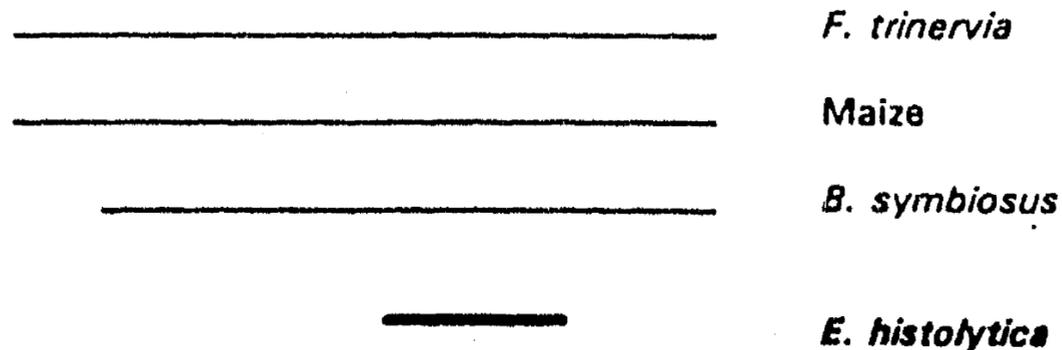


Figure 1. Partial nucleotide sequence of PPK from *E. histolytica* and location diagram of the region of homology for three enzymes whose sequences have been reported previously (5-7). The 5' end of the genes is on the left side. The length of the lines is proportional to the length of the sequences. Accession number Gen Bank L03389.

Discussion

The sequence shown in Figure 1 corresponds to a part of the PPK sequence of *E. histolytica*, because of the following reasons:

1. The enzyme has been partially purified from extracts of trophozoites (3).

2. The overall homology of the *E. histolytica* sequence with that of bacteria and plants is similar to that shown between the sequence of PPK of *B. symbiosus* and those of maize and *F. trinervia* (7).

3. This sequence shows segments of very high homology and other segments of very low homology, just as it occurs between the sequence of *B. symbiosus* and the two sequences of PPK from plants (7). One of the high homology segments corresponds to the region containing the histidine involved in catalysis, and the threonine involved in the phosphorylation/dephosphorylation reaction that regulates the activation state in the plant enzyme (6). This sequence (GGMTSAAVVAR) is identical in the three genes sequenced previously and corresponds to amino acids 450 to 461 in *B. symbiosus*, 530 to 541 in *F. trinervia*, and 524 to 535 in maize (5-7). The corresponding *E. histolytica* sequence (amino acids 9 to 18 of the fragment) is RNKTSAAVVAR, which is identical in 9 of the 12 residues and there are two conservative substitutions (G for N and M for K, respectively).

There are three other regions of very high homology with all three published sequences, which correspond to amino acids 38 to 61, 112 to 124, and 172 to 184 in the sequenced fragment. These regions are also very conserved in the other three PPK sequences.

On the basis of this evidence we conclude that this clone has a part of the sequence coding for PPK of *E. histolytica*.

PPK is an important enzyme in the photosynthetic pathway of *C.* plants. It has also been found in bacteria like *Propionibacterium shermanii*, *Acetobacter xylinum*, *Rhodospirillum rubrum* and *B. symbiosus*. The studies on structure, regulation and mechanism of action have been performed with enzymes from sugar cane, maize, *P. shermanii* and *B. symbiosus*. Even though this enzyme was discovered almost simultaneously in plants, bacteria, and *E. histolytica*, little or no work has been performed on the protozoan enzyme since that time. Since the enzyme is important in the production of ATP for *E. histolytica*, and is absent from its natural and experimental hosts,

selective inhibition of this enzyme may lead to inhibition of growth and perhaps to alternatives for prevention or treatment of amebiasis. The elucidation of the complete sequence of this enzyme might also shed some light on the evolutionary relationship between certain groups of plants and bacteria and *E. histolytica*.

References

1. McLaughlin J, Alay S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *J Protozool* 1965; 32:221.
2. Hatch MD, Slack CR. A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem J* 1968; 106:141.
3. Reeves RE. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 1968; 243:3202.
4. Reeves RE, Menzies RA, Hsu DS. The pyruvate-phosphate dikinase reaction. *J Biol Chem* 1968; 243:5486.
5. Matsuda M, Onoki Y, Yamamoto N, Hirano H, Kane-Murakami Y, Tanaka Y. Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequences. *J Biol Chem* 1988; 263:11080.
6. Roache E, Westhoff P. Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett* 1990; 273:116.
7. Pocalyko DJ, Carroll LJ, Martin BM, Babbitt PC, Dunaway-Mariano D. Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs. *Biochemistry* 1990; 29:10757.
8. Edman U, Meza I, Agabian N. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3024.
9. Mandel M, Higa A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 1970; 53:154.
10. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463.
11. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:2444.