



00551 18
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

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

299054

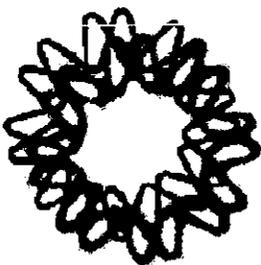
**“Clonación, expresión y citolocalización de la
proteína STT3 de *Entamoeba histolytica*: un
marcador molecular de retículo endoplásmico”.**

T E S I S

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

P R E S E N T A

**MARIA DE LOS ANGELES
GUTIERREZ HERNANDEZ**



Cuernavaca, Mor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A el **Dr. Alejandro Alagón** y a la **Dra. Rosana Sánchez López**, por sus consejos y por todo su apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

A los **Dres. Marco Antonio Ramos** y **Roberto Stock**, por el apoyo experimental y por sus acertados comentarios, durante el desarrollo de este trabajo.

A los **Dres. Joel Osuna** y **Baltazar Becerril** por haber formado parte de mi comité tutorial.

A los **Dres. Jorge Luis Folch, Rosa Uribe, Joel Osuna, Fernando Esquivel** y **Alejandro Alagón**, por sus comentarios y observaciones durante la escritura de la tesis, y por fungir como jurado del examen de grado.

A **Felipe Olvera, Alejandro Olvera** y **Olegaria Benítez**, por su apoyo técnico en el laboratorio del Dr. Alagón.

A **René Hernández** y **Maricela Olvera**, por su apoyo técnico en la unidad de secuenciación automática de ADN.

A **Paul Gaytán** y **Eugenio López**, por su apoyo técnico en la unidad de síntesis de oligonucleótidos.

A **Elizabeth Mata Moreno, Graciela Cabeza Pérez** y **Sergio González Trujillo**, por su apoyo técnico en la unidad de bioterio.

A **Angélica Linares**, por su invaluable apoyo administrativo en el laboratorio del Dr. Alagón.

A todos mis **compañeros** y **amigos** del laboratorio por todos los momentos que pasamos juntos.

ESTE LIBRO FUE IMPRESO EN:

TESIS

PIBICIS



**Internet
Club**

PASEO DE LAS FACULTADES # 41 -
A COL. COPILCO UNIVERSIDAD
C.P. 04360
TEL. 56-58-73-99

CALLE MEDICINA # 41 DEP.
1 COL. COPILCO UNIVERSIDAD
C.P. 04360
TEL. 59-25-84-35

INTERNET

COPIAS

ESCANEOS

ENGARGOLADOS

IMPRESIONES LASER Y COLOR EN INYECCION DE TINTA

LLENADO DE FACTURAS Y TODO TIPO DE FORMATOS

RENTA VENTA Y REPARACION DE COMPUTADORAS

FOTOS DIGITALES LASER AL INSTANTE

CAPTURA DE TEXTO POR CUARTILLA

TELEFONO Y FAX PUBLICO

TARJETAS AL INSTANTE

CAPTURA DE TESIS

ENMICADOS

TESIS, ENTREGA A DOMICILIO Y

PRESUPUESTOS GRATIS POR TELEFONO

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Secreción de Proteínas	1
I.2 Organización General de la Vía de Secreción en Células Eucariotes	1
I.2.1 Translocación de proteínas a través de la membrana del RE	1
I.2.2 Modificación y plegamiento de proteínas en el lumen del RE	2
I.2.3 Transporte y maduración de proteínas a través del aparato de Golgi	3
I.2.4 Transporte de proteínas a compartimentos intracelulares y membrana plasmática	4
I.3 Glicosilación de Proteínas	5
I.3.1 Síntesis de N-Glicoproteínas en el RE.....	5
I.3.1.1 Síntesis del oligosacárido ligado a un portador lipídico	5
I.3.1.1.1 Uso de dolicol como portador en la síntesis del oligosacárido	5
I.3.1.1.2 Donadores de GlcNAc, Man y Glc en el ensamblaje del oligosacárido	6
I.3.1.1.3 Ensamblaje del oligosacárido ligado a Dol-P	6
I.3.1.2 Transferencia del oligosacárido del portador lipídico a la proteína naciente en el lumen del RE	8
I.3.1.2.1 Enzima Oligosacariltransferasa.....	9
I.3.1.2.1.1 Proteína STT3	10
I.4 Aspectos Generales de <i>Entamoeba histolytica</i>	11
I.4.1 Importancia de <i>Entamoeba histolytica</i> como patógeno	11
I.4.2 Ciclo de vida	11
I.4.3 Estructura celular	12
I.4.4 Características bioquímicas	13
I.4.5 Organización genómica	13
I.4.6 Mecanismos de patogenicidad	14
I.4.7 <i>Entamoeba histolytica</i> como modelo de estudio de la vía de secreción	14
II. OBJETIVOS	16
II.1 Objetivo General	16
II.2 Objetivos Particulares	16

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
III.1 Células empleadas y Condiciones de cultivo	17
III.2 Obtención de la Secuencia Genómica que Codifica para la Proteína STT3 de <i>Entamoeba histolytica</i>	17
III.2.1 Radiomarcaje de ADN.....	17
III.2.2 Tamizado del banco genómico de <i>E. histolytica</i>	17
III.2.3 Escisión del fagémido pBluescript a partir del fago λ ZAPII.....	18
III.3 Secuenciación de ADN	19
III.4 Análisis de Secuencias e Imágenes	19
III.5 Amplificación Rápida del Extremo 3' de ADN Complementario (3'-RACE)	20
III.5.1 Síntesis de ADN complementario	20
III.5.2 Amplificación del extremo 3' de ADN complementario.....	20
III.6 Amplificación Rápida del Extremo 5' de ADN Complementario (5'-RACE)	21
III.6.1 Incorporación de nucleótidos dG en el extremo 5' del ADN complementario.....	21
III.6.2 Amplificación del extremo 5' de ADN complementario.....	21
III.7 Southern Blot	21
III.7.1 Extracción de ADN.....	21
III.7.2 Digestión de ADN genómico y electroforesis	22
III.7.3 Transferencia de los fragmentos de ADN a una membrana de nylon.....	22
III.7.4 Hibridación con la sonda radioactiva	23
III.8 Northern Blot.....	23
III.8.1 Purificación de ARN.....	23
III.8.2 Preparación de ARN poli A(+) y poli A(-).....	23
III.8.3 Electroforesis de ARN en un gel de agarosa	24
III.8.4 Transferencia e hibridación del ARN.....	24
III.9 Obtención de la Proteína <i>EhSTT3</i> Recombinante	24
III.9.1 Clonación de un fragmento del gen <i>EhSTT3</i> en el vector de expresión pQE40	24
III.9.2 Expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	25
III.9.3 Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad..	25
III.10 Obtención de Anticuerpos Policlonales anti- <i>EhSTT3</i>	26

III.10.1 Inmunización de conejos	26
III.10.2 Valoración del título de anticuerpos anti- <i>EhSTT3</i> por ELISA	26
III.10.3 Purificación de anticuerpos policlonales anti- <i>EhSTT3</i>	26
III.11 Caracterización de los anticuerpos policlonales anti- <i>EhSTT3</i>	27
III.12 Citolocalización de la proteína <i>EhSTT3</i>	28
IV. RESULTADOS.....	29
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	50
VII. APÉNDICE.....	51
VIII. REFERENCIAS	54

ABREVIATURAS

[α - ³² P]-dCTP	Trifosfato de deoxicitosina radioactivo, isótopo ³² P en el fosfato α
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ALG	Glicosilación ligada a asparagina
AP	Oligonucleótido adaptador
ARN	Acido Ribonucleico
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina Trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato
BLAST	Herramienta para la búsqueda de comparaciones basada en alineamientos locales
β -ME	2-Mercaptoetanol
C, dC, dCTP	Citosina, deoxicitosina, trifosfato de deoxicitosina
°C	Grados centígrados
<i>Cele</i>	<i>Caenorabditis elegans</i>
COP	Complejo proteico de la cubierta
CGN	Red <i>cis</i> Golgi
CTP	Citosina trifosfato
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DO	Densidad Optica
Dol	Dolicol
<i>Dmel</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DPMS	Dolicol fosfato manosa sintasa
E64	N-(N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil)-agmatina
EDTA	Acido Etilendiamino tetraacético
<i>Ehis</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Unido a Enzima
EST	"Expressed sequence tags"
<i>et al</i>	<i>et alos</i> , y colaboradores

G, dG, dGTP	Guanosina, deoxiguanosina, trifosfato de deoxiguanosina
g, mg, μ g, ng	Gramos, miligramos, microgramos, nanogramos
GDP	Guanosil difosfato
GlcNAc	N-acetil glucosamina
glu	Glucosa
GPT	N-acetil glucosamina-1-fosfato transferasa
GT	N-acetil-glucosamina transferasa
h, min, seg	Horas, minutos, segundos
<i>Hsap</i>	<i>Homo sapiens</i>
IP	Ioduro de Propidio
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
L, ml, μ l	Litros, mililitros, microlitros
M, mM, μ M, nM	Molar, milimolar, micromolar
Man	Manosa
MP	Membrana Plasmática
NBT	Azul de Tetrazolio
OST	Oligosacariltransferasa
OSTasa	Complejo Oligosacariltransferasa
P	Fosfato
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
pb, Kb	Pares de bases, kilopares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN Polimerasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de Fenilmetil Sulfonilo
RACE	Amplificación rápida de extremos de DNA complementario
RE	Retículo Endoplásmico
rpm	Revoluciones por Minuto

<i>Scer</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Ser	Serina
<i>Spom</i>	<i>Saccharomyces pompe</i>
TA	Temperatura Ambiente
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
Thr	Treonina
TH ₂ O	Agua tetradestilada
<i>Tgon</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGN	Red <i>trans</i> Golgi
TEMED	N-N-N'-N'-Tetrametil Etilendiamina
Tm	Temperatura de Desnaturalización
Tween20	Monolaurato de Sorbitol Polioxietileno (20)
U	Unidades enzimáticas
UDP	Uridil difosfato
UFP	Unidades formadoras de placas
UV	Luz Ultravioleta
WBP	"Wheat germ agglutinin binding protein"

RESUMEN

Los procesos de secreción y tráfico de proteínas en *E. histolytica* permanecen hasta la fecha ampliamente inexplorados. A pesar de la aparente falta de diferenciación de organelos celulares involucrados en el tráfico de proteínas, este parásito tiene la capacidad de secretar proteínas al medio externo como proteasas, fosfolipasas y amibaporo, importantes para la citotoxicidad. Por otro lado, también se han identificado proteínas de membrana que presentan glicosilación compleja como la lectina Gal/GalNAc, involucrada en fenómenos de adherencia. Uno de los avances para el conocimiento de los procesos de secreción amibianos consiste en la clonación y caracterización de genes que codifican para proteínas que juegan un papel clave en la vía del tráfico intracelular y de secreción. Tal es el caso del gen STT3, una subunidad del complejo oligosacariltransferasa, responsable de la *N*-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico.

La presente tesis describe la clonación y caracterización molecular, así como la localización intracelular de la proteína STT3 de *E. histolytica*. La secuencia nucleotídica del gen *EhSTT3* se aisló a partir de un tamizado de un banco genómico, empleando como sonda un fragmento del gen *EhSTT3* reportado como EST, que se complementó por el método 3' RACE. Este gen presenta un marco abierto de lectura de 2,163 pb que codifica para una proteína de 720 aminoácidos con un peso molecular teórico de 82.7 kDa. La identidad de la secuencia peptídica de la proteína *EhSTT3* con sus homólogos es de 37% a 41%. El análisis tipo Southern blot sugiere que el genoma de *E. histolytica* contiene dos copias del gen *EhSTT3* y el estudio Northern blot muestra la presencia de un solo transcrito de ~2.2 Kb. Los extremos 5' y 3' no traducidos del ARN mensajero son extremadamente cortos. Por otro lado, el extremo 5' no traducido presenta un nucleótido G adicional por lo que el ARN mensajero del gen *EhSTT3* podría ser modificado co-transcripcionalmente por "capping". Los análisis de hidropaticidad de la secuencia de la proteína *EhSTT3* indican que se trata de una proteína de membrana con 12 putativas regiones transmembranales en su estructura. La distribución intracelular de la proteína *EhSTT3* en trofozoítos de *E. histolytica* se observó co-localizada en el núcleo el cual, probablemente esté asociado físicamente a estructuras involucradas en el proceso de *N*-glicosilación y que pueden corresponder a el equivalente funcional de retículo endoplásmico.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Secreción de Proteínas

La secreción de proteínas, tanto en procariotes como en eucariotes, permite a las células interactuar con su medio ambiente. En procariotes, este proceso se lleva a cabo directamente desde el citoplasma al medio extracelular a través de la membrana periplásmica. En contraste, las células eucariotes han desarrollado una vía de secreción más compleja que consiste de varios compartimentos membranales ordenados dentro del citoplasma en los cuales se llevan a cabo diferentes procesos secuenciales como plegamiento, glicosilación, reestructuración de azúcares, entre otros, antes de secretar una determinada proteína [Honda *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1996]. En los años 70's George Palade y sus colaboradores formularon los lineamientos generales del transporte intracelular y de la vía de secreción en células exócrinas de páncreas de perro, mencionando la importancia del retículo endoplásmico (RE) y complejo de Golgi en la producción y procesamiento de proteínas destinadas a secreción [Palade, 1975].

I.2 Organización General de la Vía de Secreción en Células Eucariotes

La vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas en células eucariotes involucra las siguientes etapas: 1) conducción y translocación de la proteína nascente que presenta una secuencia señal a través de la membrana del RE; 2) *N*-glicosilación, plegamiento y oligomerización en el lumen del RE; 3) salida del RE hacia el aparato de Golgi; 4) modificación en el aparato de Golgi (*O*-glicosilación, reestructuración de azúcares, sulfatación y fosforilación); y por último, 5) transporte por medio de vesículas desde la red *trans* Golgi a su sitio de destino, ya sea compartimentos intracelulares o espacio extracelular [Sakaguchi, 1997]. La figura 1 muestra un esquema general de la vía de tráfico y secreción de proteínas en células eucariotes.

I.2.1 Translocación de proteínas a través de la membrana del RE

En células eucariotes, el primer paso en el proceso de secreción consiste en conducir y translocar a la proteína nascente a través de la membrana del RE. La síntesis de estas proteínas da inicio en ribosomas que se encuentran libres en el citosol. Posteriormente, se seleccionan por medio de una secuencia señal, generalmente presente en su extremo NH₂-terminal, que al emerger del ribosoma es reconocida por un complejo citosólico denominado SRP, un multímero ribonucleoprotéico integrado

por una molécula de 7S ARN y seis polipéptidos de 9, 14, 19, 54, 68 y 72 kDa, respectivamente [Walter y Blobel, 1982]. La asociación entre el SRP y la secuencia señal de la proteína naciente detiene o disminuye la velocidad de síntesis de la proteína y, por lo tanto, incrementa el intervalo de tiempo en el cual el complejo ribosoma-proteína naciente-SRP pueden contactar la membrana del RE a través del receptor de SRP [Walter y Blobel, 1981]. Una vez que se da la interacción entre el SRP y su receptor, el SRP es liberado al citosol y el complejo ribosoma-proteína naciente es enganchado al canal de translocación o “translocon” a través del cual la proteína atraviesa la membrana del RE [Walter y Johnson, 1994; Crowley *et al.*, 1994].

El canal de translocación está integrado, además del receptor de SRP, por el complejo Sec61 y la proteína de membrana TRAM. Estas proteínas proporcionan un ambiente cerrado y acuoso a través del cual la proteína naciente puede atravesar la membrana del RE [Johnson y van Waes, 1999]. El complejo Sec61 es un hetero-trímero integrado por Sec61 α , Sec61 β y Sec61 γ [Görlich y Rapoport, 1993]. Sorprendentemente, Sec61 α y Sec61 γ son similares a las proteínas SecY y SecE de *E. coli*, respectivamente, ambas involucradas en la translocación de proteínas a través de la membrana periplásmica [Hartmann *et al.*, 1994].

En células de mamífero, la translocación de proteínas a través de la membrana del RE es un proceso co-traducciona (acoplado con la síntesis de la proteína). Sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* la translocación de proteínas es un proceso que puede ser tanto co-traducciona como post-traducciona (la síntesis de la proteína termina en el citoplasma antes de ser enganchada a la maquinaria de translocación) [Corsi y Schekman, 1996].

I.2.2 Modificación y plegamiento de proteínas en el lumen del RE

Durante su translocación, la proteína naciente interacciona con proteínas residentes del RE que le ayudan a adquirir su conformación apropiada [Sakaguchi, 1997]. La proteína BIP, un miembro de la familia HSP70, además de ser un componente esencial de la maquinaria de translocación, se une a la proteína naciente para evitar su plegamiento prematuro y/o agregación intra- o intermolecula [Gething M, 1999]; la secuencia señal es procesada por una peptidasa de señal [Lyko *et al.*, 1995]; la enzima PDI participa en el plegamiento de proteínas catalizando la formación de

puentes disulfuro [Marcus *et al.*, 1996]; y por último, el complejo hetero-oligomérico oligosacaryltransferasa (OSTasa) participa en la transferencia de oligosacáridos a la proteína naciente a través de un mecanismo denominado N-glicosilación [Kornfeld *et al.*, 1985]. En conjunto, estas proteínas conforman un sistema de control de calidad del RE, asegurándose de que proteínas plegadas incorrectamente permanezcan en el RE unidas a Calnexina y/o Calreticulina y evitar así, que sean transportadas al aparato de Golgi [Ellgaard *et al.*, 1999].

I.2.3 Transporte y maduración de proteínas a través del aparato de Golgi

Una vez que las proteínas han sido plegadas y ensambladas correctamente en el lumen del RE, son transportadas por medio de vesículas al aparato de Golgi para su maduración y distribución. El primer paso se lleva a cabo por vesículas que se originan de regiones especializadas del RE, denominadas “elementos de transición” [Pelham, 1998], que se fusionan con la cisterna *cis* del aparato de Golgi. El tráfico vesicular anterógrado entre el RE y el *cis* Golgi se lleva a cabo por vesículas cubiertas por el complejo proteico COPII [Barlowe *et al.*, 1994]. Por otro lado, el tráfico vesicular retrógrado entre estos dos compartimentos se realiza por vesículas tipo COPI, con el fin de reciclar componentes de la maquinaria de síntesis y transporte hacia el RE [Bannykh *et al.*, 1998; Martínez-Menárguez *et al.*, 1999]. Posteriormente, las proteínas viajan, por medio de vesículas, desde la cisterna *cis* hacia la cisterna *media* hasta llegar a la cisterna *trans*, en donde alcanzan su estado de maduración final. El movimiento vesicular entre las cisternas del Golgi involucra movimiento de vesículas tipo COPI en ambas direcciones (Fig. 1). Dentro de las modificaciones más importantes que tienen lugar en las distintas cisternas del aparato de Golgi se encuentran la O-glicosilación [Tooze *et al.*, 1988], reestructuración de azúcares [Kornfeld *et al.*, 1985], sulfatación y fosforilación [Nickel *et al.*, 1998]. Las enzimas que participan en estos procesos están localizadas en las distintas cisternas del Golgi en un orden que corresponde a su secuencia de acción; por lo tanto, el aparato de Golgi puede verse como una línea de ensamblaje para la producción de proteínas correctamente glicosiladas, siendo el *trans* Golgi en donde alcanzan su estado final de maduración [Short y Barr, 2000].

I.2.4 Transporte de proteínas a compartimentos intracelulares y membrana plasmática

El proceso de distribución de proteínas a partir de la red *trans* Golgi se vuelve más complicado debido a la multitud de destinos celulares que se tienen que cubrir. Las proteínas destinadas a la membrana plasmática son transportadas en vesículas que se forman constitutivamente; mientras que, las proteínas destinadas a endosomas o lisosomas se acumulan en regiones que expresan el adaptador clatrina [Mellman y Warren, 2000]. Por otro lado, las proteínas que forman parte de la vía de secreción regulada son secuestradas en grandes vesículas que generan los gránulos de secreción densos característicos de algunas células exócrinas como las células acinares del páncreas. La formación de estos gránulos densos es una manera eficiente de concentrar y almacenar proteínas secretorias antes de ser secretadas (Fig. 1) [Orci *et al.*, 1984].

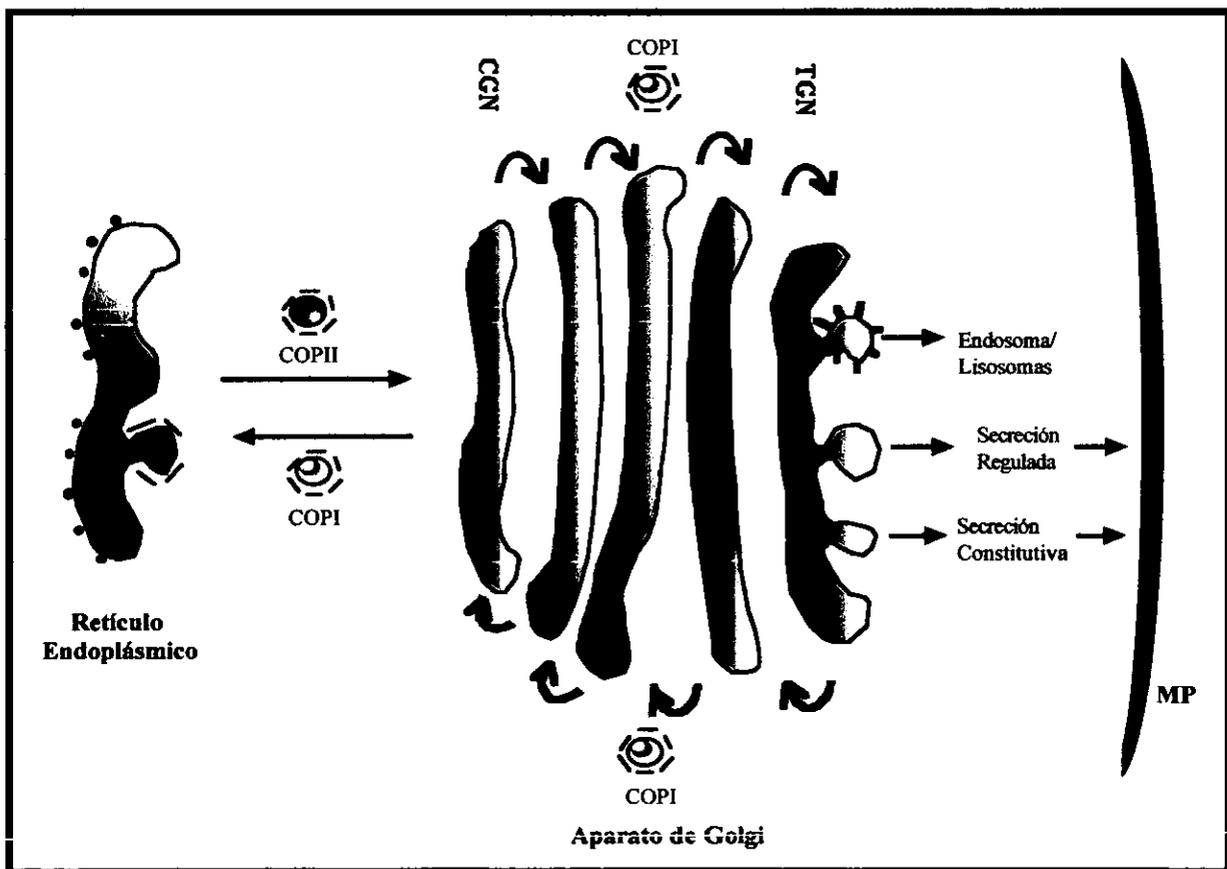


Fig. 1. Esquema general de la vía de tráfico intracelular y secreción en células eucariotes.

I.3 Glicosilación de Proteínas

La glicosilación de proteínas destinadas a la vía de tráfico intracelular y de secreción se lleva a cabo por un proceso co- y post-traducciona l altamente conservado. En células eucariotes, estas proteínas se convierten en glicoproteínas por la adición covalente de oligosacáridos tanto en el retículo endoplásmico (*N*-glicosilación: cuando el oligosacárido está ligado a la proteína a través de una asparagina) como en el aparato de Golgi (*O*-glicosilación: cuando el oligosacárido está ligado a la proteína a través de una serina o treonina) [Kukuruzinska *et al.*, 1987].

I.3.1 Síntesis de *N*-Glicoproteínas en el RE

La vía de *N*-glicosilación en células eucariotes puede dividirse en dos etapas:

1) la síntesis del oligosacárido sobre un portador lipídico en la membrana del RE y 2) la transferencia del oligosacárido, como unidad, del portador lipídico a la proteína naciente sobre residuos seleccionados de Asp [Burda y Aebi, 1999]. Las figuras 2 y 3 muestran cada una de las etapas involucradas en la síntesis de *N*-glicoproteínas en el RE.

I.3.1.1 Síntesis del oligosacárido ligado a un portador lipídico

I.3.1.1.1 Uso de dolicol como portador en la síntesis del oligosacárido

La síntesis o ensamblaje del precursor oligosacárido da inicio sobre un portador lipídico denominado Dolicol (Dol), presente en la membrana del RE. Dolicol es un lípido que pertenece a la familia de poli-isoprenoles y consta de 18 a 20 unidades de isopreno en vertebrados y 15 a 16 unidades en levadura [Hubbard e Ivatt, 1981]. Este portador actúa como acarreador en el ensamblaje del oligosacárido y como aceptor de monómeros de azúcar para la síntesis de dolicol fosfato manosa (Dol-P-Man) y dolicol fosfato glucosa (Dol-P-Glc) a partir de guanosil difosfato-manosa (GDP-Man) y uridil difosfato-glucosa (UDP-Glc), respectivamente (Fig. 2) [Hubbard e Ivatt, 1981]. Para dar inicio al ensamblaje del oligosacárido se requiere de dolicol fosfato (Dol-P); para ello, el portador lipídico es fosforilado por una dolicol cinasa dependiente de CTP o también puede ser producto de varias reacciones enzimáticas que permiten el reciclaje de esta molécula [Hubbard e Ivatt, 1981; Burda y Aebi, 1999].

I.3.1.1.2 Donadores de GlcNAc, Man y Glc en el ensamblaje del oligosacárido

Para llevar a cabo el ensamblaje del oligosacárido se requiere de tres nucleótidos donadores de azúcares: UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), GDP-manosa (GDP-Man) y UDP-glucosa (UDP-Glc) (Fig. 2) [Burda y Aebi, 1999]. Estos nucleótidos activados funcionan como donadores de azúcares en reacciones citoplásmicas o para la síntesis de Dol-P-Glc y Dol-P-Man [Burda y Aebi, 1999]. Dol-P-Glc se forma por transferencia de glucosa de UDP-Glc a Dol-P, reacción catalizada por la enzima Dol-P-Glc sintasa [te Heesen *et al.*, 1994]. Por otro lado, Dol-P-Man se genera a partir de la transferencia de manosa de GDP-Man a Dol-P, reacción que se lleva a cabo por la enzima dolicol fosfato manosa sintasa (DPMS) [Orlean *et al.*, 1988]. Tanto el Dol-P-Glc como Dol-P-Man giran hacia al lumen del RE (“flip-flop”), para llevar a cabo su función en la última etapa del ensamblaje (Fig. 2) [Hirschberg y Snider, 1987].

I.3.1.1.3 Ensamblaje del oligosacárido ligado a Dol-P

En células de levadura, el primer paso en el ensamblaje del oligosacárido ligado a dolicol sucede en el RE sobre su superficie citoplásmica, e involucra la síntesis de Dol-P-P-GlcNAc₂ por la adición secuencial de GlcNAc-1-P (*N*-acetil-glucosamina-1-fosfato) y GlcNAc a Dol-P, a partir del donador UDP-GlcNAc (Fig. 2) [Abeijon y Hirschberg, 1992]. Las enzimas que participan en la transferencia se denominan *N*-acetil-glucosamina-1-fosfato transferasa (GPT) y *N*-acetil-glucosamina transferasa (GT), respectivamente [Burda y Aebi, 1999]. La primera de estas enzimas se inhibe específicamente por el antibiótico tunicamicina (Fig. 2) [Hubbard e Ivatt, 1981].

La siguiente etapa en el proceso de *N*-glicosilación es la síntesis de Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅, y se lleva a cabo por manosilación escalonada de Dol-P-P-GlcNAc₂, en donde GDP-Man es el donador de la manosa [Hirschberg y Snider, 1987]. Antes de proseguir, el precursor oligosacárido gira hacia el lumen del RE (“flip-flop”) para continuar con la manosilación y obtener Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ (Fig. 2) [Hubbard e Ivatt, 1981; Abeijon y Hirschberg, 1992]. En el caso de las últimas cuatro reacciones de manosilación, el donador de manosa ya no es GDP-Man sino Dol-P-Man dado que los nucleótidos donadores de azúcar no pueden girar hacia el lumen del RE [Perez y Hirschberg, 1986]. La enzima β-1,4 manosiltransferasa, producto del gen ALG1, y la enzima producto del gen ALG2, son las responsables de transferir el primero y segundo residuo de manosa, respectivamente [Kukuruzinska *et al.*, 1987]. Por otro lado, las

siguientes reacciones de manosilación se llevan a cabo por enzimas que están siendo caracterizadas [Burda y Aebi, 1999].

Para finalizar, el precursor oligosacárido es glicosilado para obtener como producto final Dol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃ (Fig. 2). En esta última etapa de ensamblaje, Dol-P-Glc es el donador de los tres monómeros de glucosa y al igual que Dol-P-Man, tiene que girar hacia el lumen del RE. Las enzimas que realizan la transferencia de los monómeros de glucosa son producto de los genes ALG6, ALG8 y ALG10, respectivamente [Burda y Aebi, 1999].

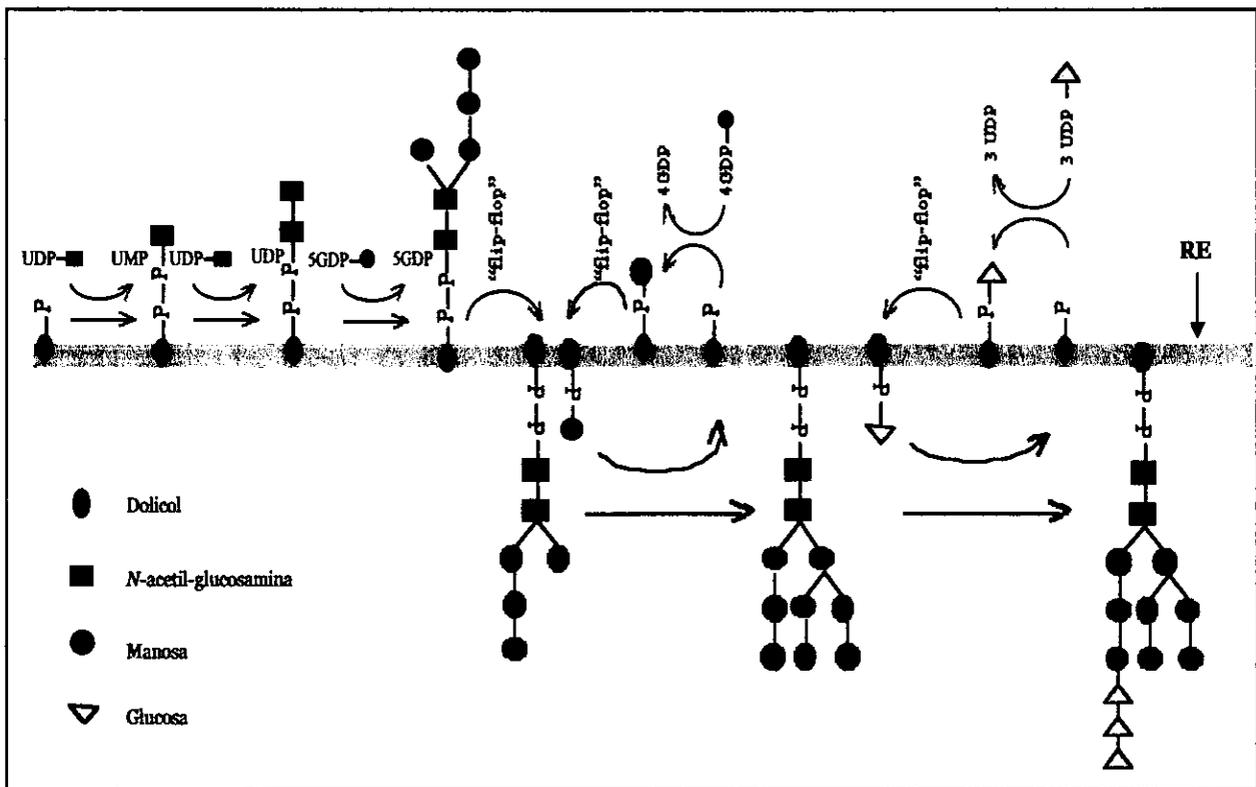


Fig. 2. Síntesis del precursor oligosacárido GlcNAc₂Man₉Glc₃ sobre el portador lipídico dolicol en la membrana del RE.

I.3.1.2 Transferencia del oligosacárido del portador lipídico a la proteína naciente en el lumen del RE

La segunda etapa en el proceso de *N*-glicosilación se lleva a cabo por la enzima oligosacariltransferasa (OSTasa). Esta enzima es responsable de catalizar la transferencia *en bloque* del grupo oligosacárido rico en manosa (GlcNAc₂Man₉Glc₃) del portador lipídico a un residuo seleccionado de Asn que se encuentra dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína naciente en el lumen del RE (Fig. 3). Un gran número de aminoácidos pueden ocupar la posición X excepto Prolina, cuya posición en X no favorece el reconocimiento por la enzima OSTasa [Marshall,1972]. Estudios realizados con polipéptidos modelo han demostrado que los sitios funcionales de *N*-glicosilación se localizan principalmente en curvaturas tipo Asn (una conformación local similar a las curvaturas β) [Imperiali *et al.*, 1992].

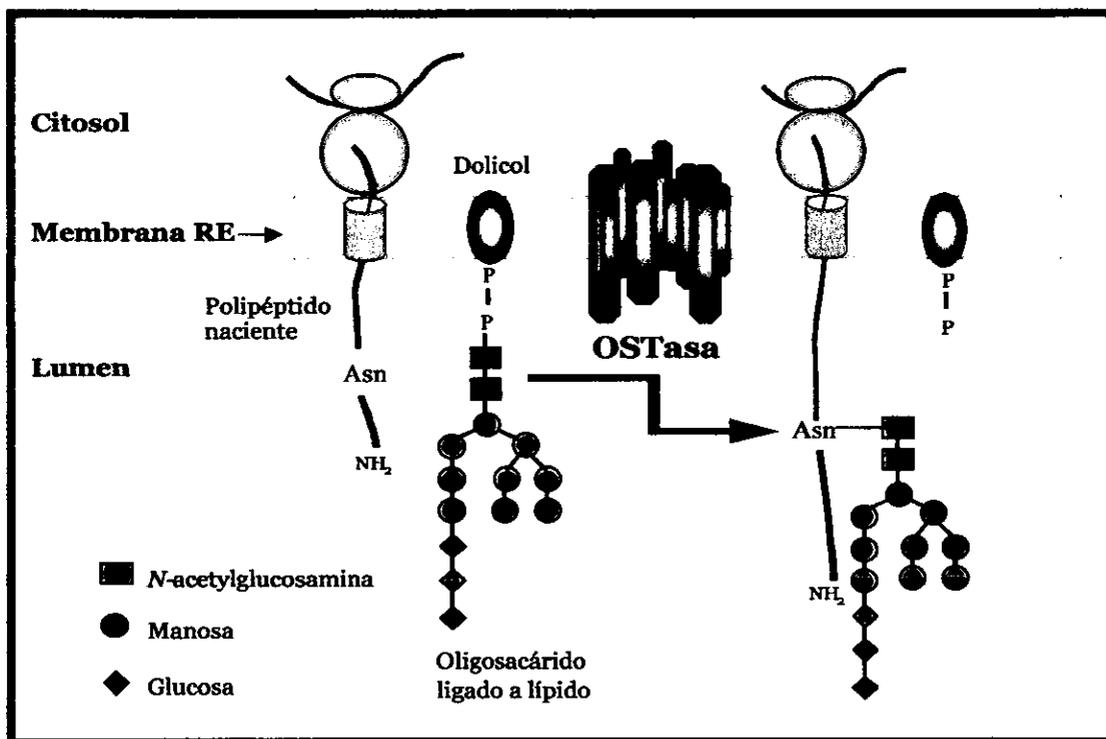


Fig. 3. *N*-glicosilación. La enzima oligosacariltransferasa (OSTasa), presente en la membrana del RE, lleva a cabo la transferencia del precursor oligosacárido (GlcNAc₂Man₉Glc₃) del protador lipídico a la proteína naciente dentro de la secuencia consenso Ans-X-Ser/Thr.

I.3.1.2.1 Enzima Oligosacariltransferasa

La enzima oligosacariltransferasa de células de levadura es un complejo hetero-oligomérico integrado por 9 subunidades, presentes en la membrana del RE, que presentan un alto grado de conservación estructural a lo largo de la evolución [WBP1, SWP1, OST2, OST1, OST5, STT3, OST3, OST4 y OST6] (Fig. 4) [Kanauer y Lehle, 1999]. Estudios de co-inmunoprecipitación han revelado que estas subunidades se encuentran organizadas en tres subcomplejos que corresponden a: WBP1-SWP1-OST2 [te Hessen *et al.*, 1993; Silberstein *et al.*, 1995], OST1-OST5 [Reiss *et al.*, 1997] y STT3-OST3-OST4 [Zufferey *et al.*, 1995; Spiring *et al.*, 1997; Karaoglu *et al.*, 1997]. Hasta la fecha resulta difícil explicar el porqué esta enzima requiere de varias subunidades distintas para llevar a cabo su actividad óptima. Por otro lado, el estudio de este complejo ha sido complicado dada la complejidad de su ambiente y a la multiplicidad de subunidades que lo integran.

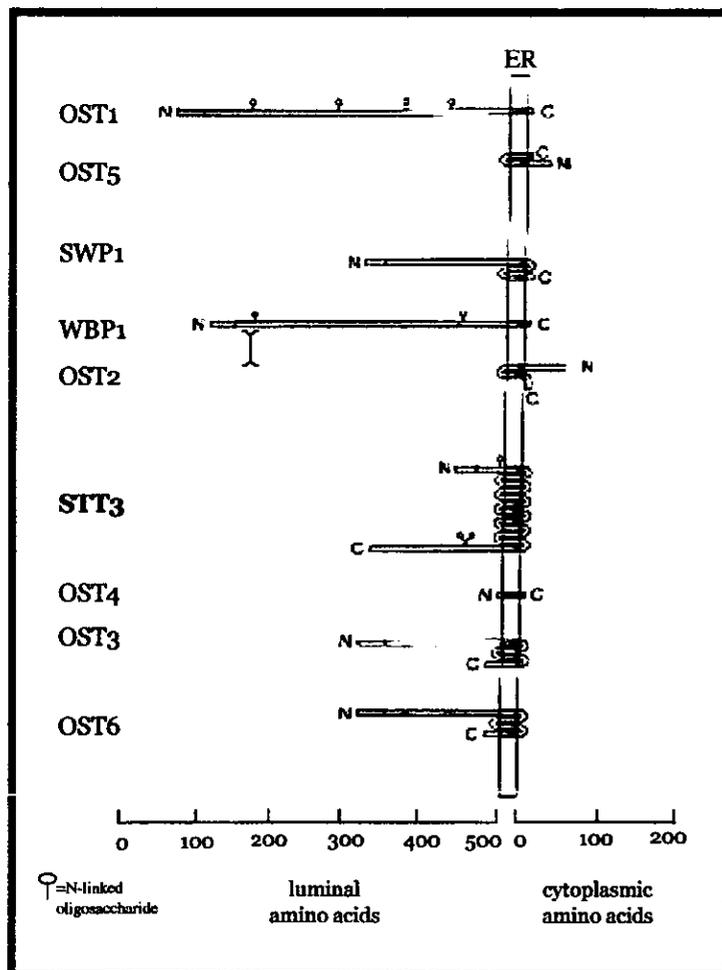


Fig. 4. Enzima oligosacariltransferasa de *Sacharomyces cerevisiae*. Esta figura muestra la disposición de las subunidades que integran el complejo OSTasa en la membrana del RE. Como puede observarse, la proteína STT3, una de las subunidades más conservadas, presenta en su estructura 12 regiones transmembrales, un extremo COOH-terminal orientado hacia el lumen del RE que corresponde a la tercera parte de la proteína y tres sitios potenciales de *N*-glicosilación [Knauer y Lehle, 1999].

I.3.1.2.1.1 Proteína STT3

El gen que codifica para la proteína STT3 se identificó por primera vez en mutantes de levadura sensibles a la temperatura y a estaurosporina; este último, un potente inhibidor de la proteína cinasa C (PKC1) [Yoshida *et al.*, 1992]. Posteriormente, se demostró que la proteína STT3 está involucrada en la *N*-glicosilación de proteínas [Yoshida *et al.*, 1995]. El gen STT3 de levadura es esencial y codifica para una proteína de membrana de RE cuyo peso molecular es de 78 kDa [Yoshida *et al.*, 1992]. El análisis de la secuencia polipeptídica indica que se trata de una proteína que presenta en su estructura 12 regiones transmembranales, tres sitios potenciales de *N*-glicosilación y un extremo COOH-terminal hidrofílico que abarca la tercera parte de la proteína y está orientado hacia el lumen del RE (Fig. 4) [Yoshida *et al.*, 1992; Zufferey *et al.*, 1995]. Actualmente, se sabe que la proteína STT3 es un componente esencial del complejo OSTasa que no se había detectado inicialmente en ninguno de los complejos aislados debido a que presenta una movilidad anómala en gel, ya que migra como una banda difusa de 60 kDa y se tiñe débilmente con azul de Commassie o plata [Karaoglu *et al.*, 1997; Spiring *et al.*, 1997]. La proteína STT3 es necesaria para la estabilidad y/o ensamblaje del complejo OSTasa y además, es el componente más conservado del mismo en células eucariotes [Zufferey *et al.*, 1995].

I.4 Aspectos Generales de Entamoeba histolytica

I.4.1 Importancia de *Entamoeba histolytica* como patógeno

Entamoeba histolytica es el agente etiológico de la amibiasis en humanos. A nivel mundial, la amibiasis se considera la tercera causa de muerte provocada por parásitos, después de la malaria y la esquistosomiasis. Se estima que alrededor de 500 millones de personas en todo el mundo están infectadas, de las cuales sólo el 10% son sintomáticos, presentando principalmente disenteria amibiana como consecuencia de la invasión de la mucosa intestinal por trofozoitos de *E. histolytica* [Walsh, 1986]. En ocasiones, el parásito puede llegar a diseminarse vía sanguínea causando lesiones extraintestinales de tipo absceso hepático amibiano. En México, al menos un millón de casos de amibiasis y más de 1,000 muertes son reportadas anualmente [Caballero-Salcedo *et al.*, 1994].

I.4.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* comprende cuatro estadios consecutivos: prequiste, quiste, metaquiste y trofozoito. La investigación sobre el ciclo biológico de *E. histolytica* se ha centrado con mayor interés tanto en el trofozoito (forma invasora) como en el quiste (forma infectiva), ya que ambos son los principales responsables del cuadro clínico.

La infección con *E. histolytica* se produce por ingestión de quistes maduros a través del agua y alimentos contaminados. Posteriormente, los quistes descienden a través del tubo digestivo hasta el intestino delgado en donde, previo al contacto con los jugos gástricos, se inicia el proceso de desenquistamiento, dando lugar a un trofozoito tetranucleado. En este estadio, la amiba lleva a cabo un ciclo de replicación nuclear seguida de tres ciclos de división celular, dando origen a 8 trofozoitos mononucleados, potencialmente invasivos. Cuando las condiciones de su ambiente no le son propicias, los trofozoitos pasan pronto a la etapa de prequiste, cuya maduración involucra dos ciclos de replicación nuclear sin división celular, quedando al final del ciclo un quiste maduro tetranucleado protegido por una pared rígida rica en quitina. Por último, los quistes son excretados junto con las heces y pueden sobrevivir durante varias semanas en el exterior si la temperatura se encuentra entre los 28 y 34°C (Fig. 5) [Martínez-Palomo, 1993].

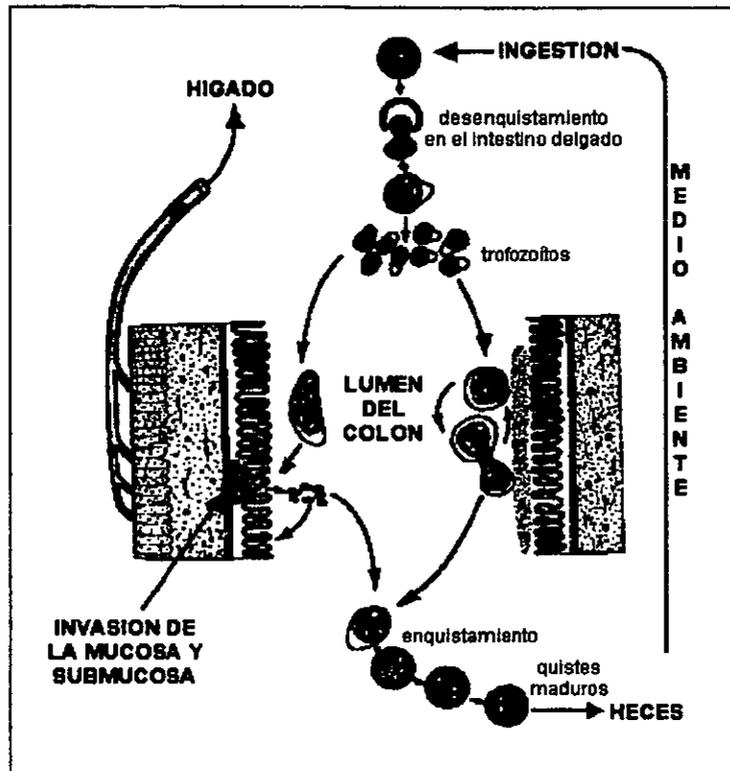


Fig. 5. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.

I.4.3 Estructura celular

Entamoeba histolytica es, al parecer, uno de los organismos eucariotes más primitivos con una organización celular sencilla. La forma invasora y móvil de este parásito, el trofozoito, es una célula altamente dinámica y pleomórfica cuyo diámetro se encuentra entre los 10 y 60 μm . El citoplasma del trofozoito puede ser descrito más por los organelos de los que carece, que por los que presenta. No hay evidencia morfológica de algunas estructuras típicas presentes en eucariotes superiores como: citoesqueleto estructurado, mitocondrias, peroxisomas y un sistema equivalente al retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Por otro lado, una proporción considerable del citoplasma del trofozoito está ocupada por una población heterogénea de vesículas y vacuolas con diámetros que van desde los 0.5 μm hasta los 9 μm [Martínez-Palomo, 1986]. El núcleo de la amiba es de 3.5 μm de diámetro y el número de núcleos por célula puede variar de 1 a 4, dependiendo del estadio celular. La división nuclear ocurre por mitosis cerrada, ya que la membrana nuclear no se fragmenta. Los lisosomas difieren de

las células eucariotes típicas en que las enzimas no se encuentran de forma soluble, sino que son parte integral de la membrana [Martínez-Palomo, 1982]. Los ribosomas se encuentran agrupados con frecuencia en cúmulos helicoidales.

El quiste o forma infectiva, es un cuerpo redondo de paredes gruesas que mide entre 8 y 20 μm de diámetro. La pared de los quistes es rica en quitina y está compuesta por elementos fibrilares que forman una red compacta [Martínez-Palomo, 1986].

I.4.4 Características bioquímicas

El metabolismo de *Entamoeba histolytica*, tal y como podría esperarse, está adaptado a un ambiente bajo en oxígeno. Es un organismo aerobio facultativo capaz de crecer en atmósferas que contienen hasta 5% de oxígeno [Martínez-Palomo, 1982]. Los carbohidratos constituyen la principal fuente de energía del parásito. El catabolismo de la glucosa en la amiba, carente de mitocondria, difiere considerablemente del de la mayoría de las células eucariotes, ya que posee enzimas glicolíticas poco usuales y carece de citocromos y del ciclo de ácido cítrico. Una adaptación poco común es la función de pirofosfato inorgánico, generalmente considerado un producto final del metabolismo, como fuente de energía, reemplazando al ATP en varias reacciones glicolíticas [Martínez-Palomo, 1986]. El análisis de los lípidos membranales ha mostrado el predominio de la etanolamina sobre la colina. Se ha encontrado un fosfolípido poco común, la ceramida aminoetil fosfonato y abundante fosfatidilcolina. También se han detectado por lo menos 12 glicoproteínas principales con pesos moleculares entre 12,000 y 200,000 kDa [Aley *et al.*, 1980].

I.4.5 Organización genómica

A pesar de su importancia médica, poco se conoce sobre la organización genómica de *Entamoeba histolytica*. Algunos datos muestran que su cromatina está organizada en partículas similares a nucleosomas, condensados por proteínas de unión a ADN que difieren de las histonas típicas [Torres-Guerrero *et al.*, 1991]. Se ha encontrado que el ADN genómico de *E. histolytica* está organizado en cromosomas cuyo tamaño varía entre 300 y 2,000 Kb [Valdés *et al.*, 1990]. El tamaño del genoma se calcula que es de aproximadamente 3.7×10^8 pb [Gelderman *et al.*, 1971; Bhattacharya *et al.*, 2000]. El contenido de G + C en el genoma de *E. histolytica* es de 25% [Gelderman *et al.*, 1971]. En secuencias codificantes, el contenido de G + C es de 33%, con una

preferencia de uso de codones con A/T en la tercera posición [Char y Fahthing, 1992; Tannich y Horstmann, 1992]. Una comparación entre ADN complementario y secuencias genómicas revelan la existencia de pocos intrones (3%), con un tamaño menor a los 100 nucleótidos y con todos los elementos encontrados en eucariotes superiores [Lohia y Samuelson, 1993; Urban *et al.*, 1996; Plaimauer *et al.*, 1993]. Las regiones 5' y 3' no codificantes de los RNA mensajeros son relativamente cortas [Bruchhaus *et al.*, 1993]. Los ARN ribosomales están codificados en secuencias extracromosomales circulares de 24.5 Kb, de las cuales existen aproximadamente 200 copias por célula [Bhattacharya *et al.*, 1989; Hubber *et al.*, 1989]. El número de cromosomas y la ploidía de *E. histolytica* no han sido determinados con exactitud.

I.4.6 Mecanismos de patogenicidad

Entamoeba histolytica es un parásito que debe su nombre a su capacidad de destruir tejidos. El efecto patógeno de *E. histolytica* incluye varios factores de virulencia como: adhesión de los trofozoitos a las células blanco, actividad citolítica y fagocitosis. La adhesión de los trofozoitos a las células blanco ocurre principalmente por medio de la lectina de superficie de 170 kDa que se une a residuos terminales de Gal-GalNAc de glicoproteínas presentes en la superficie de la célula blanco [Petri *et al.*, 1989]. Otras moléculas involucradas en la adhesión del trofozoito incluyen una lectina de 220 kDa [Rosales-Encina *et al.*, 1987], una adhesina de 112 kDa [Arroyo y Orozco, 1987] y un lipofosfoglicano [Stanley *et al.*, 1992]. Una vez que los trofozoitos de *E. histolytica* establecieron contacto directo con la célula blanco, se lleva a cabo un segundo evento de patogenicidad que incluye la secreción de mediadores líticos como péptidos formadores de poro o amibaporo [Leippe *et al.*, 1991], cisteín proteasas [Que y Reed, 2000], fosfolipasa A [Long-Krug *et al.*, 1985] y colagenasa [Muñoz *et al.*, 1982]. Por último, *E. histolytica* fagocita a las células previamente lisadas y degrada cada uno de los componentes orgánicos ingeridos por medio de potentes enzimas hidrolíticas localizadas en las vacuolas citoplásmicas de los trofozoitos [Martínez-Palomo, 1986].

I.4.7 *Entamoeba histolytica* como modelo de estudio de la vía de secreción

A pesar de que en *E. histolytica* no se han identificado los equivalentes funcionales del retículo endoplásmico ni aparato de Golgi, está bien documentado que este parásito tiene una gran capacidad de modificar y secretar proteínas, de lo que depende, en gran medida, la patogenicidad y otros fenómenos vitales de este

protozoario. En los últimos años se han realizado diversos estudios para determinar el equivalente funcional de retículo endoplásmico y aparato de Golgi en *E. histolytica*. Se han llevado a cabo análisis citoquímicos con DiOC6 y C6-NBD-ceramida que tiñen RE y Golgi, respectivamente [Mazzuco *et al.*, 1997]. Por otro lado, se han determinado actividades enzimáticas de glicosilación como GPT (*N*-acetil-glucosamina-1P-transferasa), GT (*N*-acetil-glucosamina-transferasa) [Vargas-Rodríguez *et al.*, 1998] y DPMS (dolicol fosfato manosa sintasa) [Villagómez-Castro *et al.*, 1998]. En el laboratorio del Dr. Alagón se han clonado y caracterizado varios genes que codifican para proteínas que juegan un papel clave en la vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas en células eucariotes como: ERD2, un receptor del *cis*-Golgi que participa en el transporte retrógrado de proteínas hacia el RE [Sánchez-López *et al.*, 1998]; SRP54, componente del complejo SRP que participa en el mecanismo de reconocimiento de la secuencia señal [Ramos *et al.*, 1997]; BIP, una proteína residente del RE que funciona como chaperona en el plegamiento de polipéptidos nacientes [Gosh *et al.*, 1999]; PDI, una enzima que cataliza la formación de puentes disulfuro en el lumen del RE [Ramos *et al.*, 2000]; Sec61 α , un componente del canal de translocación [Sánchez-López *et al.*, 2000]; y por último, Rab8, una GTPasa de bajo peso molecular involucrada en el tráfico vesicular [Juárez *et al.*, 2000]. En conjunto, los estudios realizados hasta el momento sugieren la presencia de equivalentes funcionales al RE y aparato de Golgi en *E. histolytica*. Por lo tanto, la clonación y caracterización del gen STT3 de *E. histolytica*, una subunidad del complejo oligosacariltransferasa, nos permitirá contribuir en la determinación de los equivalentes funcionales de RE, involucrado en la *N*-glicosilación de proteínas en células eucariotes.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo General

II.1.1 Clonar, expresar y caracterizar el gen que codifica para la proteína STT3 de *Entamoeba histolytica* y determinar su localización intracelular en el estadio de trofozoito.

II.2 Objetivos Particulares

II.2.1 Aislar y secuenciar el gen que codifica para la proteína STT3 de *E. histolytica*.

II.2.2 Realizar un análisis comparativo entre la secuencia obtenida y secuencias homólogas a STT3.

II.2.3 Determinar el número de copias del gen STT3 presentes en el genoma de *E. histolytica*.

II.2.4 Caracterizar el tamaño del transcrito y las regiones no traducidas del gen *EhSTT3*.

II.2.5 Expresar y purificar la proteína *EhSTT3* recombinante.

II.2.6 Obtener y purificar los anticuerpos policlonales anti-*EhSTT3*.

II.2.7 Caracterizar los anticuerpos policlonales *anti-EhSTT3*.

II.2.8 Determinar la localización intracelular de la proteína STT3 en trofozoitos de *E. histolytica*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Células empleadas y Condiciones de cultivo

La cepa XL1-Blue MRF' de *E.coli* (Stratagene) se utilizó en el tamizado del banco genómico para la infección con el bacteriofago λ , así como para la expresión de la proteína recombinante. El cultivo celular de esta cepa se llevó a cabo a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) sólido o líquido según sea el caso.

Para la caracterización de los anticuerpos anti-*Eh*STT3 y citolocalización de la proteína STT3 se utilizaron trofozoitos de la cepa HK9 de *E. histolytica* cultivados en medio TY1-S-33 a 37°C bajo condiciones axénicas [Diamond *et al.*, 1978].

III.2 Obtención de la Secuencia Genómica que Codifica para la Proteína STT3 de Entamoeba histolytica

III.2.1 Radiomarcaje de ADN

Para llevar a cabo el marcaje radioactivo de sondas de ADN se utilizó el estuche comercial Random Primer Extension Labeling System (NEN Life Science Products). Para cada reacción se utilizaron entre 25 y 50 ng de ADN que se marcó de acuerdo a las instrucciones del proveedor con $\alpha^{32}\text{P}$ -[dCTP].

La marca radioactiva no incorporada se eliminó usando una columna de Sefadex G-50 (SIGMA) y la incorporación de la misma al ADN se cuantificó mediante el cálculo de la actividad específica expresada en cpm/ μg de ADN.

III.2.2 Tamizado del banco genómico de *E. histolytica*

El banco genómico de *E. histolytica* HM1:IMSS que empleamos en este trabajo fue proporcionado por el Dr. Ruy Pérez Monfort del Instituto de Fisiología Celular-UNAM [Pérez-Monfort y Saavedra-Lira, 1994]. Este banco se construyó a partir de fragmentos de ADN genómico de *E. histolytica* generados por digestión con la enzima *Eco*RI y clonados en el sitio correspondiente del fago λ ZAP Π (Stratagene).

Para realizar el tamizado se infectaron 600 μl de células XL1-Blue MRF' ($A_{600} = 0.6-0.8$) con 100 μl de fagos a 2.5×10^5 ufp/ml durante 15 min a 37°C.

Inmediatamente, se les adicionaron 6 ml de medio NZY-agar suave y se vertieron sobre cajas Petri que se incubaron a 37°C durante 12 hrs. Las placas de lisis generadas se transfirieron, por duplicado, a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) con un tiempo de 2 y 4 min, respectivamente. Posteriormente, cada membrana se trató durante 2 min con la solución de desnaturalización [1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH], seguidos de 5 min con la solución de neutralización [1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)] y por último, 30 seg en la solución de lavado [0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)-2X SSC]. Por último, el ADN de las placas de lisis se fijó a la membrana durante 2 hrs con vacío a 80°C.

Para continuar con la identificación de las clonas de interés, la membrana se pre-hibridó en 30 ml de la solución de hibridación [50% formamida, 1X Denhardt's, 5X SSC, 1M NaH₂PO₄ (pH 6.5), 1% SDS] a 42°C durante 16 hrs. Posteriormente, se hibridó con la sonda radioactiva (3.2x10⁵ cpm/ml) y ADN de esperma de salmón (100 mg/ml), previamente desnaturalizados, en 20 ml de solución de hibridación fresca a 42°C durante 16 hrs. Para finalizar, cada filtro se lavó durante 30 min con la solución 2X SET [50 mM NaCl, 3 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 mM EDTA] a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de 1 hr con 2X SETS [2X SET, 1% SDS] y un lavado de alta astringencia con 2X SETS a 50°C. Por último, los filtros fueron expuestos a películas sensibles (Kodak) por un periodo de 10 días y se revelaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las posibles clonas positivas identificadas se sometieron a un segundo tamizado con el fin de eliminar los falsos positivos.

III.2.3 Escisión del fagémido pBluescript a partir del fago λZAPII

La escisión del fagémido que contiene el inserto de interés se llevó a cabo inoculando la cepa *E. coli* XL0LR en medio NZY y XL1-Blue MRF' en medio LB suplementado con 0.2% maltosa y 10 mM MgSO₄. Ambos cultivos se crecieron durante 12 hrs a 37°C con agitación. Se infectaron 200 µl de células XL1-Blue MRF' (A₆₀₀ = 1.0) con 250 µl de fagos positivos (1x10⁵ partículas de fagos) en presencia de 1 µl del fago "helper" ExAssist (1x10⁶ ufp/µl) durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se les adicionaron 3 ml de medio NZY y se incubaron a 37°C durante 3 hrs. Al terminó de la incubación, se calentó el tubo a 70°C durante 20 min y se centrifugó 15 min a 3,000 rpm, recuperando en el sobrenadante el fagémido pBluescript-inserto escindido y empacado como partículas de fago filamentoso.

Para sembrar los fagémidos escindidos, se incubaron 200 μ l de células XL0LR con 100 μ l y 10 μ l de fagémidos escindidos, respectivamente, durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 300 μ l de medio NZY y se incubaron a 37°C durante 45 min. Por último, se plaquearon 0.1 μ l y 1 μ l en cajas LB- ampicilina y se incubaron por 12 hrs.

III.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI Prism (Perkin-Elmer) utilizando los oligonucleótidos universales SK, KS, FW, RV, T4 y T7, así como oligonucleótidos específicos para el gen STT3 de *E. histolytica*.

III.4 Análisis de Secuencias e Imágenes

- Para analizar secuencias de ADN:

Las secuencias que se obtuvieron se analizaron en los programas Sequencing Project y DNA Alignment del paquete GeneWorks 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.) para Mac y el Programa CODONPREFERENCE del paquete GCG para Unix.

- Diseño de Oligonucleótidos:

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo con ayuda del programa OLIGO 4.03 (National Biosciences, Inc.) para Mac.

- Traducción de la secuencia nucleotídica y análisis de la secuencia polipeptídica:

La secuencia nucleotídica que se obtuvo se tradujo en el programa *translate* del paquete GeneWorks 2.5.1 y el análisis de la secuencia polipeptídica se realizó en la sección Proteomic tools del servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System, www.expasy.ch).

- Análisis de homologías y alineamientos:

La búsqueda de homologías en bases de datos se realizó usando el programa BLAST en el servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo en el programa Protein Alignment del paquete GeneWorks. La matriz de identidades y similitudes se obtuvo empleando el programa ClustalX 1.81 para Mac y visualizada con el programa MaxBoxshade 2.15.

- Análisis hidropático de la secuencia polipeptídica:

El análisis hidropático de la proteína se llevó a cabo en la sección Proteomic tools del servidor ExPASy y en el programa Hydropathy profile del paquete GeneWorks.

- **Análisis y procesamiento de imágenes:**

La reconstrucción volumétrica de los planos confocales se llevó a cabo en el programa Voxel View 2.5 (Vital Images) para Silicon Graphics. El análisis de las imágenes se realizó en los programas NIH Image 1.62 y Adobe Photoshop 2.5.

III.5 Amplificación Rápida del Extremo 3' de ADN Complementario (3' RACE)

III.5.1 Síntesis de ADN complementario

Para realizar la síntesis de ADN complementario se utilizaron 500 ng de ARN poli A(+) de *E. histolytica*. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando 200 U de la enzima SuperScript II RT (Gibco-BRL) en una mezcla de reacción que incluye 10 μ moles del oligonucleótido AP (ver apéndice), 10 mM de deoxinucleótidos, 25 mM de $MgCl_2$, 0.1 M de DTT, 0.2 M Tris-HCl (pH 8.4) y 0.5 M KCl en un volumen final de 20 μ l. La reacción se realizó durante 15 min a 42°C. Posteriormente, la enzima se inactivó a 70°C por 15 min y luego, el ARN de las moléculas híbridas se digirió con 1 U de la enzima Ribonucleasa H (Gibco BRL) durante 20 min a 37°C.

III.5.2 Amplificación del extremo 3' de ADN complementario

Para amplificar el extremo 3' del transcrito del gen *EhSTT3* se realizó un PCR a partir de 2 μ l del ADN complementario junto con 10 μ moles del oligonucleótido AUAP-B y 10 μ moles del oligonucleótido STT3.1s (ver apéndice). La amplificación se realizó mediante 1 ciclo de 1 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 42°C, 3 min a 72°C y por último, 1 ciclo de 7 min a 72°C. Posteriormente, se llevó a cabo una re-amplificación empleando como cadena molde 2 μ l del primer PCR y los oligonucleótidos STT3.2s y AUAP-B. A diferencia del primer PCR, la temperatura de apareamiento se cambió a 50°C, con el fin de aumentar la especificidad de la reacción. Los productos de cada amplificación se analizaron en un gel de 1% agarosa.

III.6 Amplificación Rápida del Extremo 5' de ADN Complementario (5' RACE)

III.6.1 Incorporación de nucleótidos dG en el extremo 5' del ADN complementario

Previo a la amplificación del extremo 5' del transcrito del gen *EhSTT3* se llevó a cabo la incorporación de residuos dG en el extremo 5' del ADN complementario sintetizado anteriormente. La reacción se llevó a cabo con 1 U de la enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (TdT, Gibco BRL) en una mezcla que incluye 5 µl de ADN complementario, 1 mM de dGTP, 100 µM de cacodilato de potasio (pH 7.2), 1 mM de CoCl₂ y 100 µM de DTT, en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, la enzima se inactivó a 70°C por 15 min y el ADN complementario-5' dG se precipitó con 2.5 vol de etanol en presencia de glicógeno y 3 M acetato de sodio (pH 4.8).

III.6.2 Amplificación del extremo 5' de ADN complementario

Para amplificar el extremo 5' del transcrito del gen *EhSTT3* se realizó un PCR a partir de 2 µl del ADN complementario-5'-dG junto con 10 pmoles del oligonucleótido dC y 10 pmoles del oligonucleótido STT3.2a (ver apéndice). La amplificación se realizó mediante 1 ciclo de 1 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 42°C, 3 min a 72°C y por último, 1 ciclo de 7 min a 72°C. Posteriormente, se llevó a cabo una re-amplificación empleando como cadena molde 2 µl del primer PCR y los oligonucleótidos STT3.5a y el oligonucleótido dC. A diferencia del primer PCR, la temperatura de apareamiento se cambió a 50°C, con el fin de aumentar la especificidad de la reacción. Los productos de cada amplificación se analizaron en un gel de 1% agarosa.

III.7 Southern Blot

III.7.1 Extracción de ADN

El ADN genómico de *E. histolytica* se purificó a partir de un paquete celular proveniente de 8 botellas de cultivo (8×10^7 trofozoitos). Las células se resuspendieron en 2 ml de la solución de lisis [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 24 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.6 mM espermidina, 0.5 mM ácido iodoacético] con agitación suave y se lisaron con 300 µl de 10% Nonidet p-40. Para separar los núcleos del resto de los componentes

celulares, se pasó el lisado total a través de un colchón de sacarosa [1M sacarosa, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 24 mM KCl, 10 mM MgCl₂] que se centrifugó a 6,500 rpm durante 10 min. La pastilla celular, que contiene los núcleos, se resuspendió en 2 ml de la solución de lisis y se pasó nuevamente a través de un colchón de sacarosa. La lisis de los núcleos se realizó con 2 mg de proteinasa K (MERCK) que se adicionó directamente sobre la pastilla e inmediatamente, se le agregaron 3 ml de la solución Proteínasa K y se incubó por 1 hr a 37°C.

El ADN se obtuvo tras realizar una extracción con fenol-cloroformo (1:1), seguida una incubación de 10 min a TA con 15 µl de RNAsa libre de DNAsa (10 mg/ml), para continuar con dos extracciones con fenol-cloroformo:isoamílico (24:1). El ADN presente en la fase acuosa de la última extracción, se precipitó con etanol absoluto a -20°C durante 12 hrs. Posteriormente, se centrifugó a 7,000 rpm por 30 min, la pastilla se lavó varias veces con etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de TE. Para determinar la calidad del ADN, éste se analizó en un gel de 1% agarosa y se cuantificó por el método fluorométrico utilizando YOPRO-1 (Molecular Probes).

III.7.2 Digestión de ADN genómico y electroforesis

Porciones de 4 µg de DNA genómico se digirieron con 3 µl de las enzimas *AccI*, *ClaI* y *EcoRI* (New England BioLabs) a 37°C por 16 hrs y los fragmentos de digestión se migraron en un gel de 1.2% agarosa durante 12 hrs.

III.7.3 Transferencia de los fragmentos de ADN a una membrana de nylon

Previo a la transferencia, el ADN se depurinó con 0.25 mM HCl por 20 min y se desnaturalizó con 0.4 M NaOH durante 30 min. Posteriormente, el gel se colocó sobre un soporte de acrílico cubierto con papel filtro que se mantuvo en un depósito en contacto con la solución 0.4 N NaOH. Sobre el gel se colocó la membrana Hybond N+ (Amersham International) evitando la formación de burbujas. Después de la membrana se colocaron tres capas de papel filtro y varias capas de papel absorbente y finalmente, se colocó un objeto de 0.5 Kg que fomenta la transferencia por capilaridad. Al término de la transferencia, el filtro se lavó 10 min con la solución de transferencia y posteriormente, con la solución de neutralización [0.2 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1X SSC, 0.5% SDS] durante 10 min con agitación suave.

III.7.4 Hibridación con la sonda radioactiva

La membrana se pre-hibridó en 30 ml de la solución de hibridación [50% formamida, 1X Denhardt's, 5X SSC, 1M NaH₂PO₄ (pH 6.5), 1% SDS] a 42°C durante 16 hrs. Posteriormente, se hibridó con la sonda radioactiva (25x10⁵ cpm/ml) en presencia de ADN de esperma de salmón (100 mg/ml), previamente desnaturalizados a 100°C durante 5 min, en 20 ml de solución de hibridación fresca a 42°C durante 16 hrs. La membrana se lavó tres veces con 2X SSC-0.1% SDS a TA durante 1 hr y por último, se realizó un lavado de alta astringencia con 0.2X SSC-0.1% SDS a 50°C por 30 min. Finalmente, la membrana se expuso en una pantalla Phosphorimager (Molecular Dynamics) y se reveló a las 48 hrs de exposición.

III.8 Northern Blot

III.8.1 Purificación de ARN

El ARN se purificó a partir de un paquete celular proveniente de 8 botellas de cultivo (~ 80x10⁶ trofozoitos). El paquete se resuspendió en 10 ml de TRIzol (Gibco BRL) y la lisis se llevó a cabo mediante agitación con vórtex durante 1 min. El lisado se mantuvo a 4°C por 6 hrs. Posteriormente, se le adicionaron 10 ml de cloroformo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, seguido de una precipitación con 1 vol de isopropanol. El ARN se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y la pastilla se lavó con 10 ml de 75% etanol y se resuspendió en 2 ml de agua tratada con 0.1% dietilpirocarbonato (DEPC).

III.8.2 Preparación de ARN poli A(+) y poli A(-)

El ARN poliadenilado se purificó por cromatografía de afinidad empleando oligo dT-celulosa (Sigma Chemicals). Para ello, se resuspendieron 0.5 gr de oligo dT-celulosa en 1 ml de 0.1 N NaOH y se transfirió a una columna de cromatografía (Bio-Rad). El oligo dT-celulosa se lavó con 3 vol de agua tratada con 0.1% DEPC y se equilibró con 5 vol de la solución 1X de pegado [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA (pH 8), 0.1% SDS]. Por otro lado, el ARN se desnaturalizó durante 15 min a 65°C e inmediatamente se pasó a hielo, se le adicionó 1 vol de la solución 2X de pegado y se aplicó a la columna. Se colectarán fracciones de 0.5 ml que fueron nuevamente desnaturalizadas a 65°C durante 15 min y se volvieron a pasar por la columna. El ARN se colectó por segunda vez en fracciones de 1 ml (ARN no poliadenilado). Al terminar

de coleccionar, la columna se lavó con 10 vol de la solución 1X de pegado, seguido de 5 vol de solución de lavado [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.1 M LiCl, 1 mM EDTA (pH 8), 0.1% SDS]. El ARN poliadenilado se eluyó de la columna con 2 mM EDTA y se coleccionó en fracciones de 0.5 ml. La concentración de cada una de las fracciones obtenidas se determinó por densidad óptica a 260 nm. Tanto el ARN poliadenilado como el no poliadenilado se precipitaron con 2.5 vol de etanol en presencia de 0.18 M NaCl durante 12 hrs a -20°C .

III.8.3 Electroforesis de ARN en un gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa a una concentración de 1.2% en presencia de 2.2 M formaldehído y de la solución MOPS 1X [25 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, ajustando a pH 7 con NaOH]. Se cargaron 1 μg de ARN poliadenilado y 1 μg de ARN no poliadenilado y se migraron a 100 volts a corriente constante. Una vez que finalizó la migración, el gel se lavó dos veces con 0.1% de DEPC por 40 min para retirar todo el formaldehído y se equilibró con la solución 10X SSC [3M NaCl, Citrato de Sodio 0.3 M, ajustar a pH 7].

III.8.4 Transferencia e hibridación del ARN

La transferencia e hibridación del ARN se llevó a cabo de la misma manera que en el Southern blot con excepción de la solución de transferencia que para este caso se utilizó 10X SSC.

III.9 Obtención de la Proteína EhSTT3 recombinante

III.9.1 Clonación de un fragmento del gen *EhSTT3* en el vector de expresión pQE40

A partir del producto de la técnica 3' RACE se generó por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III un fragmento de 366 pb que corresponde a la secuencia 1,232-1,592 del gen *EhSTT3*. Este fragmento se clonó en el vector de expresión pQE40 y la reacción de ligación se utilizó para transformar por choque térmico células XL1-Blue competentes. Posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias que contenían el plásmido-inserto por medio de un análisis de restricción de los plásmidos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III.

III.9.2 Expresión de la proteína recombinante en *E. coli*

La expresión de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*Eh*STT3 se llevó a cabo en células XL1-Blue que fueron transformadas con los plásmidos pQE40 que contenían el inserto de 366 pb. Se inocularon 10 ml de medio LB más ampicilina (20 mg/ml) (Sigma Chemicals) con las células de interés y se crecieron por 12 hrs a 37°C con agitación. Posteriormente, se tomaron 8 ml de este precultivo y se inocularon en 100 ml de medio LB fresco con ampicilina. Las células se crecieron durante 1.5 hrs a 37°C con agitación ($A_{600}=0.6-0.8$). Una vez alcanzada la densidad óptica, se adicionó IPTG (Research Organics) a una concentración final de 1 mM y se incubó durante 3 hrs a 37°C con agitación. Al finalizar, las células se cosecharon en tubos Falcon de 50 ml y la pastilla celular se guardó a -70°C.

III.9.3 Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*Eh*STT3 se llevó a cabo a partir de lisados totales de *E. coli* bajo condiciones desnaturalizantes. Para ello, las células que fueron previamente tratadas con IPTG se resuspendieron en 5 ml/gr de peso de la solución de lisis [100 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M Urea, 10 mM Imidazol] y se lisaron por sonicación a una amplitud de 40% (Sonics & Materials Inc.). Posteriormente, el lisado se clarificó por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min. La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo por cromatografía de afinidad a Niquel. Para ello, el clarificado se mezcló con 3 ml de 50% agarosa-Ni-NTA (QIAGEN) y se acopló por 2 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se transfirió a una columna de cromatografía (Bio-Rad) y se lavó con 100 ml de la solución de lavado [100 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M Urea, 20 mM Imidazol]. A continuación, la proteína se eluyó con 10 ml de la solución de elución [100 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M Urea, 250 mM Imidazol] y la concentración de la proteína presente en la fracciones colectadas se cuantificó por A_{280} (1 U de A_{280} es equivalente a 1 mg/ml de proteína). Para determinar el grado de pureza de las fracciones colectadas se analizaron en un del 15% SDS-PAGE.

III.10 Obtención de Anticuerpos Policlonales anti-EhSTT3

III.10.1 Inmunización de conejos

Para obtener anticuerpos policlonales anti-EhSTT3 se llevó a cabo la inmunización de conejos de la cepa NZW con 100 µg de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-EhSTT3 en presencia de adyuvante de Freund. Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada 15 días por un periodo de tres meses.

III.10.2 Valoración del título de anticuerpos anti-EhSTT3 por ELISA

Los títulos de anticuerpos anti-EhSTT3 se determinaron a partir de la tercera inmunización. Para ello, se sensibilizaron placas para ELISA de 96 pozos Maxisorp (NUNC) con 5 µg/ml de antígeno de captura (proteína recombinante) disuelto en la solución 0.1 M carbonato de sodio (pH 9.5) y se incubó durante 12 hrs a 4°C. Posteriormente, se bloquearon todos los sitios de unión inespecífica con la solución de bloqueo [50 mM Tris-HCl (pH 8), 0.5% de gelatina, 0.2% Tween 20] por 2 hrs a TA. El reconocimiento primario se llevó a cabo utilizando diluciones seriadas de 1:3 del suero en solución de reacción [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 mg/ml de gelatina, 0.05% de Tween 20] durante 1 hr a TA. Posteriormente, se incubó la placa de ELISA con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (ZYMED) diluido 1:2,000 en solución de reacción por 1 hr a TA para generar una reacción cromogénica. El revelado de la reacción se realizó durante 5 min con 500 µg/ml de ABTS (Boehringer Mannheim) en tH₂O y amortiguador ABTS 10X. La reacción se detuvo con 25 µl de ácido fluorhídrico concentrado/pozo y por último, se determinó la absorbancia de la reacción a 405 nm en un lector automático (Bio-Rad) por medio del programa Microplate Manager 4.0.

III.10.3 Purificación de anticuerpos anti-EhSTT3

Los anticuerpos policlonales anti-EhSTT3 se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad empleando como inmunoadsorbente a la proteína recombinante 6xHis-DHFR-EhSTT3 acoplada a una matriz insoluble (sefarosa 4B). Para ello, se hidrataron 0.5 gr de sefarosa 4B-CNBr (SIGMA) con la solución 1 mM de ácido clorhídrico y se mezcló con 1.5 mg de proteína recombinante previamente dializada con la solución 0.1 M NaHCO₃-2M urea. El acoplamiento se llevó a cabo durante 12 hrs a temperatura ambiente y la eficiencia del mismo se cuantificó siguiendo las instrucciones del

proveedor. Posteriormente, se inactivaron grupos residuales con 100 μ l de 1 M Tris-HCl (pH 8.0) y por último, la sefarosa 4B-proteína recombinante se transfirió a una columna de cromatografía (Bio-Rad).

Previo a la purificación de los anticuerpos, se llevó a cabo la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio al 50% de saturación. Al terminar, las inmunoglobulinas precipitadas se recircularon varias veces a través de la columna para permitir que los anticuerpos interaccionaran con el inmunoadsorbente. Posteriormente, se lavó la columna con 10 vol de 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) seguida de 10 vol de 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)-0.5 M NaCl. La elución de los anticuerpos específicos se realizó con 0.1 M ácido acético y se equilibraron con 1M Tris-HCL (pH 8.0) inmediatamente después de la elución. La concentración de los mismos se determinó por A_{280} (1.35 U de A_{280} corresponde a 1 mg/ml de anticuerpo). Los anticuerpos se conservaron con 0.02% azida de sodio y 3 mg/ml de trehalosa (SIGMA).

III.11 Caracterización de los anticuerpos anti-EhSTT3

La caracterización de los anticuerpos se llevó a cabo por ensayo tipo Western blot. Para ello, se prepararon lisados totales de trofozoitos de *E. histolytica* mediante lisis directa en solución de carga 1X [5% glicerol, 1.25% SDS, 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.5% 2-mercaptoetanol, 0.001% azul de bromofenol] en presencia de 2.5 mM PMSF y 500 μ M E64. Las proteínas provenientes de los lisados totales se desnaturalizaron a 100°C durante 10 min y se separaron de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en geles de 10-15% SDS-PAGE. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 1 hr en un sistema de transferencia semi-seca HEP-1 (OWL). Una vez terminada la transferencia, se bloquearon todos los sitios de unión inespecífica a la membrana con 5% leche descremada Carnation disuelta en la solución TBST [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20] por 12 hrs. El reconocimiento primario se llevó a cabo incubando la membrana durante 1 hr con 1 μ g/ml de anticuerpos policlonales anti-EhSTT3. El reconocimiento secundario se realizó con un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED) diluido 1:1000 para generar una reacción cromogénica. Para revelar la reacción se añadieron los sustratos NBT/BCIP (ZYMED).

III.12 Citolocalización de la proteína EhSTT3

Se sembraron trofozoitos amibianos de la cepa HK9 sobre un cubreobjetos en una placa de cultivo de 6 pozos (NUNC) y se crecieron durante 12 hrs a 37°C en una cámara anaeróbica. Posteriormente, se llevó a cabo la fijación de los trofozoitos con 4% paraformaldehído por 30 min a 37°C y se permeabilizaron con 0.2% Tritón X-100 durante 15 min a TA. El bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 5% leche descremada Carnation en PBS 1X por 1 hr a 37°C. Los trofozoitos adheridos a los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo anti-EhSTT3 a una concentración de 5 µg/ml en solución de bloqueo durante 1 hr a 37°C. Posteriormente se incubaron con un segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a Alexa 488 (Molecular Probes) diluido 1:1000 en solución de bloqueo por 1 hr a 37°C. Para realizar co-tinción de núcleo con IP se llevó a cabo un tratamiento previo de las células con 150 µg/ml RNAsa durante 20 min a 37°C y se tiñeron con 2 µg/ml de yoduro de propidio por 5 min a TA. Por último, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos en presencia de la solución Vectashield (Molecular Probes), quedando listos para ser observados al microscopio confocal Bio-Rad MRC 600. Los cortes de los planos focales se utilizaron para realizar construcciones volumétricas de trofozoitos de *E. histolytica*, usando el programa Voxel View 2.5 (Vital Images) para Silicon Graphics.

IV. RESULTADOS

IV.1 Obtención de la Secuencia Genómica que Codifica para la Proteína STT3 de E. histolytica

IV.1.1 Tamizado de un banco genómico de *E. histolytica*

El gen *EhSTT3* se aisló a partir de un tamizado de un banco genómico de *E. histolytica*. Como sonda se utilizó un fragmento de 186 pb del gen *EhSTT3* reportado como EST (Fig. 10) [Tanaka *et al.*, 1997]. La amplificación de este fragmento se llevó a cabo por PCR a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos *EhSTT3.1s* y *EhSTT3.2a*, diseñados en base a la secuencia reportada (ver apéndice). Como resultado, se aislaron 14 clonas independientes tipo pBSSK (-) con insertos flanqueados por el sitio de restricción *EcoRI*. Para determinar la identidad de las clonas se realizó un análisis de restricción múltiple con las enzimas de restricción *EcoRI*, *SspI*, *AluI*, *HaeIII* y *HpaI*. Al analizar el producto de la digestión con la enzima *EcoRI* se observó que todas las clonas liberan un fragmento de aproximadamente 3.8 Kb que corresponde al tamaño de los insertos. Por otro lado, el patrón de restricción que se generó con el resto de las enzimas fue el mismo para todas las clonas, dependiendo de la enzima, lo que sugiere que las 14 clonas que se aislaron son idénticas.

IV.1.2 Secuenciación de las clonas aisladas

Con el fin de facilitar la caracterización de las clonas aisladas y dada la identidad de las mismas, se seleccionaron tres clonas: 2.1.2, 2.1.3 y 6.1.7. Los insertos de estas clonas se secuenciaron parcialmente en sus extremos utilizando los oligonucleótidos universales SK y KS, específicos del fagémido pBSSK (-). Posteriormente, se realizó un alineamiento en GeneWorks entre las secuencias de cada clona, generadas con cada uno de los oligonucleótidos, cuyo resultado confirmó la identidad de las mismas. Por otro lado, también se llevó a cabo un análisis tipo BLAST, observándose que las secuencias obtenidas con el oligonucleótido KS presentan homología con secuencias tipo STT3 de otros organismos; mientras que, las secuencias que se obtuvieron con el oligonucleótido SK presentan homología con una proteína cinasa cuya secuencia no se caracterizó dado que por el momento no es de nuestro interés. De esta manera, se logró determinar la orientación de las secuencias con homología a STT3 con respecto a los oligonucleótidos que flanquean los insertos (Fig. 6).

homología a STT3 con respecto a los oligonucleótidos que flanquean los insertos (Fig. 6).

Posteriormente, se realizó un alineamiento entre las secuencias de las tres clonas con homología a STT3 y el fragmento de 186 pb. Los resultados indican que los insertos contienen aproximadamente 1,200 pb que corresponden al extremo 5' del gen *EhSTT3* y por lo tanto, la secuencia del mismo se encuentra truncada hacia su extremo 3' debido a la presencia de un sitio *EcoRI* interno.

Con el fin de facilitar el proceso de secuenciación del gen *EhSTT3* hacia su extremo 5' dado que el tamaño de los insertos es bastante grande, se realizó un análisis de restricción de la clona 2.1.2 para generar fragmentos de menor tamaño. Para ello, se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *NdeI* que juntas, generaron un patrón de restricción de 5 bandas: 1) una banda de ~3.0 Kb que corresponde al fagémido pBSSK (-); 2) una banda de ~1.6 Kb; 3) una banda de ~1.4 Kb; 4) una banda de ~0.65 Kb cuya secuencia corresponde a un fragmento del gen *EhSTT3* ya secuenciado y 5) una banda de ~0.15 Kb que casi no se observa en el gel por ser muy pequeña pero se conoce por secuencia. Los fragmentos de ~1.6 y ~1.4 Kb se subclonaron en pBSSK (-) y se secuenciaron con los oligonucleótidos SK y KS. La secuencia que corresponde al fragmento de ~1.4 Kb permitió finalizar la secuenciación del gen *EhSTT3* hacia su extremo 5'.

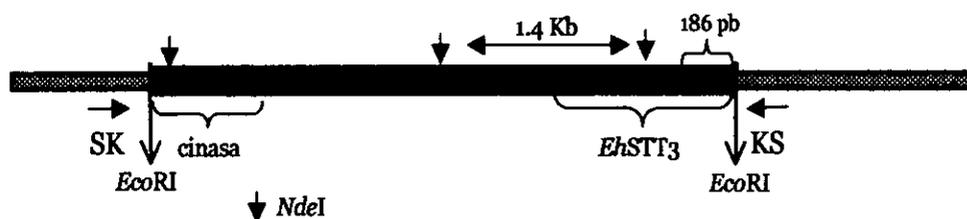


Fig. 6. Organización de las clonas aisladas a partir del tamizado del banco genómico.

IV.1.3 Obtención de la secuencia 3' del gen *EhSTT3*

El extremo 3' del gen *EhSTT3* se aisló por PCR utilizando como templado ADN complementario de *E. histolytica* sintetizado a partir de ARN poli A(+) y los

oligonucleótidos *EhSTT3.1s* y AUAP-B (ver apéndice). Posteriormente, se llevó a cabo una segunda re-amplificación empleando como templado el producto del primer PCR y los oligonucleótidos *EhSTT3.2s* y AUAP-B (ver apéndice). Como producto de la re-amplificación se generó un fragmento de ~950 pb que se clonó en el vector pBSSK (-) y se secuenció con los oligonucleótidos SK y KS. La identidad de la secuencia se confirmó por medio de un análisis tipo BLAST. El empalme de la secuencia producto de la técnica 3' RACE con la secuencia de la clona genómica nos permitió determinar la secuencia completa del gen *EhSTT3* (Fig. 7).

IV.1.4 Análisis de la secuencia *EhSTT3*

El gen *EhSTT3* presenta un marco abierto de lectura de 2,163 pb que codifica para una proteína de 720 aminoácidos que no presenta intrones y cuyo peso molecular teórico es de 82.79 kDa (Fig. 7). El análisis sobre el uso preferencial de codones del gen *EhSTT3* se realizó en el programa CodonPreference del GCG y mostró, que su secuencia presenta, como se esperaba, un uso preferencial de codones de *E. histolytica* conservado en el primer marco abierto de lectura (Fig. 8). Además, la composición de bases de este gen presenta un contenido por arriba del 70% de A y T, característica de genes amibianos (Tabla 1).

Por complementariedad:		
Residuos	No. de Nucleótidos	Porcentaje
A+T	1596	74%
G+C	567	26%

Tabla 1. Composición de bases del gen *STT3* de *E. histolytica*.

En la región promotora del gen *EhSTT3* se identificó por homología de secuencia una caja TATA putativa, TATTAAA, en la posición -87. Por otro lado, las regiones no traducidas del ARN mensajero del gen *EhSTT3* se determinaron por medio de la técnica 5' y 3' RACE. El extremo 5' no traducido del ARN mensajero es de 10 pb e inicia con el tetranucleótido AATA, que es modificado probablemente por "capping" dado que se observa una G adicional en el extremo 5' no presente en la secuencia genómica (Fig. 7). Por otro lado, como producto de la técnica 3' RACE, se generó un fragmento de aproximadamente 950 pb que se clonó en pBSSK (-) y se secuenció con los

CODONPREFERENCE of: STT3.sq Ck: 1732, 1 to 2163 May 16, 2000 17:50
Codon Table: codonusage.cod PrefWindow: 25 Rare Codon Threshold: 0.10
BiasWindow: 25 Density: 71.0

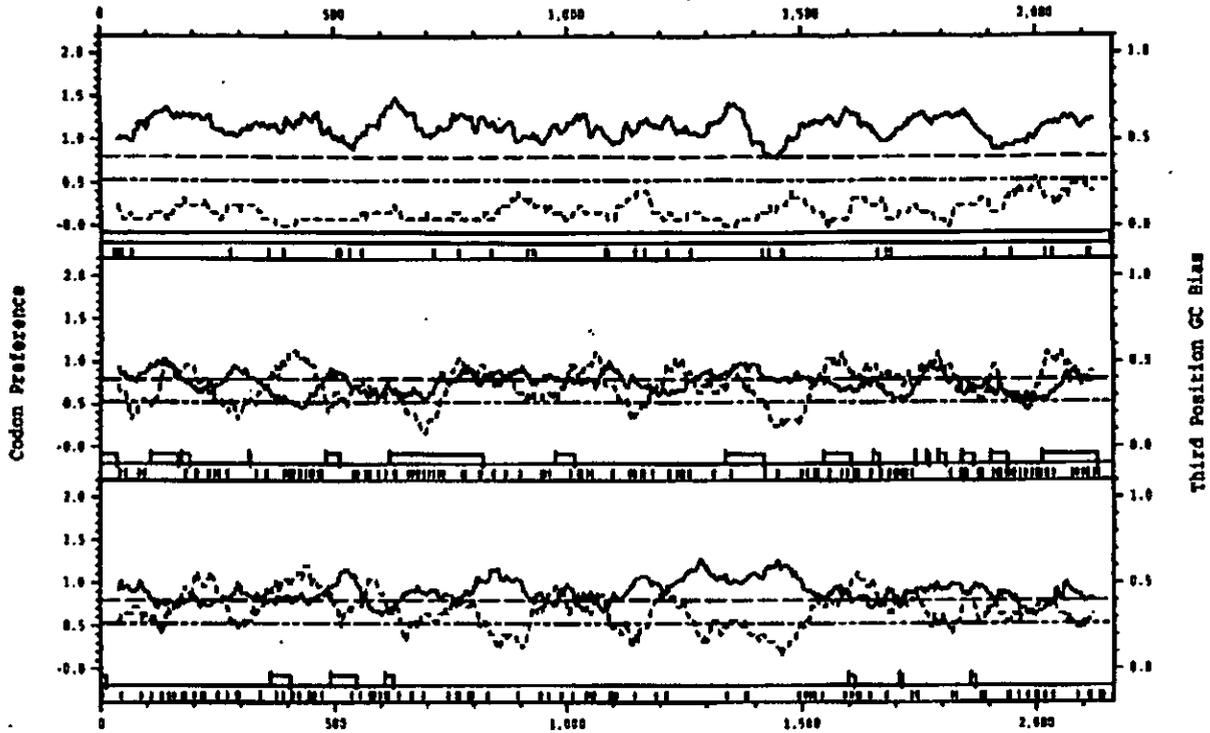


Fig. 8. Uso preferencial de codones de *E. histolytica*. Esta figura muestra tres marcos de lectura. Como puede observarse, el gen *EhSTT3* presenta un uso preferencial de codones de este parásito conservado en el primer marco abierto de lectura.

IV.1.5 Identidad de la proteína *EhSTT3* con secuencias homólogas

La matriz de identidades entre secuencias STT3 de diferentes organismos revela que la proteína *EhSTT3* presenta una identidad de 41 % con *H. sapiens* (*Hsap*), 37.5% con su homólogo *D. melanogaster* (*Dmel*) [No. de Acceso P46975] y 39% con *T. gondii*(*Tgon*) [No. de Acceso CAB38944], *C. elegans* (*Cele*) [No. de Acceso P46975], *S. cerevisiae* (*Scer*) [[No. de Acceso P46977] y *S. pompe* (*Spom*) [No. de Acceso CAA22192] (Fig. 9). La identidad de la proteína *EhSTT3* con sus homólogos se confirmó por alineamiento de secuencias como se ilustra en la figura 10.

		Similitud						
		<i>Dmel</i>	<i>Cele</i>	<i>Hsap</i>	<i>Tgon</i>	<i>Scer</i>	<i>Spom</i>	<i>Ehis</i>
Identidad	<i>Dmel</i>	----	75.0	64.5	63.0	62.9	62.4	51.0
	<i>Cele</i>	64.4	----	64.8	62.7	62.7	63.7	53.3
	<i>Hsap</i>	52.9	52.5	----	61.1	61.0	62.0	57.6
	<i>Tgon</i>	50.3	50.1	48.8	----	99.9	70.4	52.6
	<i>Scer</i>	50.1	50.1	48.7	99.9	----	70.4	52.6
	<i>Spom</i>	49.7	50.9	48.3	56.9	56.9	----	53.5
	<i>Ehis</i>	37.5	39.8	41.4	39.0	39.0	39.9	----

Fig. 9. Matriz de identidad/similitud entre secuencias homólogas a STT3 de *E. histolytica*. Se realizó una matriz de distancias mediante un alineamiento múltiple usando el programa Clustal X y se visualizó en el programa MacBoxshade. Los valores de comparación de la secuencia amibiana con sus homólogos se muestra en negritas.

<i>Scerevisiae</i>	1	MGS--DRSCVLSVPQTLLKLVIFVAIFGAAISSRLFAVIRFESIHEFDPIWFNYRAIIVLVNNSFYIKF	66
<i>Hsapiens</i>	1	MTKFG-FLRLSYEKQDTLLKLLILSMAAVLSFSTRLFAVIRFESIHEFDPIWFNYRIRFLAEEGFFYIKF	68
<i>Dmelanogaster</i>	1	MNRTPKMLNSKVAGYSLLITFAILLIAWLAGFSSRLEAYIRFESIHEFDPIWFNYRAIIVLVNNGWYINFF	69
<i>Ehistolytica</i>	1	MG----FFKTLVQ--LIUKNIGITLLIC-IIAFSSRLYSIVMYFAIHEEDPIWFNYRAIIVLVYEHQPTAIF	62
<i>Scerevisiae</i>	67	LNWFDRIITWYPLGRVITGGTLYPGLMITSAFIWHALLRNWLGLPIDIRNVCVLFAPLFSGVTIAWATYEFTRK	135
<i>Hsapiens</i>	69	HNWFDRIAWYPLGRIIGGTLYPGLMITSAFIYHVL--HFFHIITDIRNVCVLFAPLFSFITSIVTYLUTK	136
<i>Dmelanogaster</i>	70	LNWFDRIAWYPLGRIVGGTLYPGLMITSGGIHWL--HVLNIPYHIRDCVLFAPLFSGLTISITLYLUTK	137
<i>Ehistolytica</i>	63	MNWFDIPDSWYPLGRNIGTIVFPGLMITSAFIFKFL--AYFNLIIDVRLICVCMGPIYSVITICIVAYIFGS	130
<i>Scerevisiae</i>	136	EIKDAIAGILAAAGFIAIVPGYISRSVAGSYDNEAIIATLIMVTFFMFWIKAKGTGSIMHATCAALIFYFYM	204
<i>Hsapiens</i>	137	EIKDAIAGILAAAMIAIVPGYISRSVAGSYDNEGIIAIFCMLLTYMWNIAVKTGSIWAAKCALIAYFYM	205
<i>Dmelanogaster</i>	138	ELWSIAGILFAASFIAIVPGYISRSVAGSYDNEGIIAIFAIDFTYFLVYRIVKVTGSSVFWSAAALISYFYM	206
<i>Ehistolytica</i>	131	RVHSDRAGIFAAALISVYPGYMSRSVAGSYDYECISITITLITTFYLRVIAVYHNNSPILSAVTAISYFYM	199
<i>Scerevisiae</i>	205	VSAWGGYVFIINLIPLHVFLDIIMGRYSKILYSAYITWYAIGFVASMOTFFVGFLLPFRSNDHMAALGVF	273
<i>Hsapiens</i>	206	VSSWGGYVFIINLIPLHVFLVLMLTGRISHRIVVAYCTVYVCLGIIISROISFVGFQPIVLSSEHMAAGFVVF	274
<i>Dmelanogaster</i>	207	VSAWGGYVFIINLIPLHVFLIMGRYSPIILLTYSYITWYIIGTLFMSMOLFVGFQPIRITSSEHMAALGVF	275
<i>Ehistolytica</i>	200	ASITWGLYVFIINLIPLHVLISIFCGFVINKKLYSCYSTYIFATILSMOVIFFINYVPIRSEHIGAMGVF	268
<i>Scerevisiae</i>	274	GIIQIIVAFGDFVKGOISTAKFKVIMVSLFLIILVLGVVGLSADITYMGLTAPWITGRFYSIWDITNYAKIHI	342
<i>Hsapiens</i>	275	GLQQIIVAFVDYLRSKINPQQFEVIFRYSIIVLGVVLLTVGALLMLTGRISAPWITGRFYSIWDITPSYAKNNI	343
<i>Dmelanogaster</i>	276	VIIIMAVTLRHLQSVLSRNEERKULFVGGILVGVGVFAVVVITLMLGVYAPWISGRFYSIWDITPSYAKIHI	344
<i>Ehistolytica</i>	269	GICQLIELYSLHKLIIGQKKTVEIIVIKKVLMSGVIIGIIMVLIIVKIGVLSAWISGREYALFDPTFAKKN	337
<i>Scerevisiae</i>	343	PIIASVSEHOPVSWPAFEFDLIFLIVLFRAGVFLFLDLKDEHVFFVIAVSVLCSYFAVGMVRLMLITITP	411
<i>Hsapiens</i>	344	PIIASVSEHOPVSWPAFEFDLIFLIVLFRAGVFLFLDLKDEHVFFVIAVSVLCSYFAVGMVRLMLITITP	412
<i>Dmelanogaster</i>	345	PIIASVSEHOPVSWPAFEFDLIFLIVLFRAGVFLFLDLKDEHVFFVIAVSVLCSYFAVGMVRLMLITITP	413
<i>Ehistolytica</i>	338	PIIVSVSEHOPANWPAFEFDLIFLIVLFRAGVFLFLDLKDEHVFFVIAVSVLCSYFAVGMVRLMLITITP	406
<i>Scerevisiae</i>	412	VIGVSAAVLSKIFDIY--DD-----F-----KT-----SDRKYAIKP	442
<i>Hsapiens</i>	413	VIGVSAAVLSKIFDIY--DD-----F-----KT-----SDRKYAIKP	442
<i>Dmelanogaster</i>	414	VIGVSAAVLSKIFDIY--DD-----F-----KT-----SDRKYAIKP	449
<i>Ehistolytica</i>	407	VIGVSAAVLSKIFDIY--DD-----F-----KT-----SDRKYAIKP	475
<i>Scerevisiae</i>	443	AALLAKLIVSGSE--IFVLYLDFVHSITWVTRITAYSSFSVVLPSQTPDCKKLALIDDFREAYYWRMNSD	508
<i>Hsapiens</i>	450	YPIKIEVASGMILVMAKRIITTYTFSITWVTRITAYSSFSVVLPSQTPDCKKLALIDDFREAYYWRMNSD	517
<i>Dmelanogaster</i>	480	TGVSNLSKIVILAVLMLMMFAVHCITWVTRITAYSSFSVVLPSQTPDCKKLALIDDFREAYYWRMNSD	548
<i>Ehistolytica</i>	476	FIIIFIMTIVGIIILIFLKFREYSIQ--MSKNYSVSVVLYGNHGG--KQIAFDVIREAYYWRMNSD	540
<i>Scerevisiae</i>	509	EDSKVIAAWWDYGYOIGGNADRITLVDNNTWNNTHRIALVGVKAMASFEERSYEILKEIDVDYVLLVIFGGLI	577
<i>Hsapiens</i>	518	EDAKVMSWWDYGYOITAMANKRITLVDNNTWNNTHIRVGVKAMASFEERSYEILKEIDVDYVLLVIFGGLI	586
<i>Dmelanogaster</i>	549	DDARVMSWWDYGYOIAQMANRITLVDNNTWNNTHIRVGVKAMASFEERSYEILKEIDVDYVLLVIFGGLI	617
<i>Ehistolytica</i>	541	EGSRVMSWWDYGYOISHTANRITLVDNNTWNNTHIRVGVKAMASFEERSYEILKEIDVDYVLLVIFGGLI	609
<i>Scerevisiae</i>	578	EGGDDINKFLWVRIRISEGIWPE-EIKR-RYFYTAEGEYRVDARASETMRNSLLYKMSYKDFPQLFNGG	644
<i>Hsapiens</i>	587	GYSDDINKFLWVRIRIGSDTDGKHKEVDYI-TPTGIEFRVDREGLPVLLNCLMYKMSYRFGQVYTEA	654
<i>Dmelanogaster</i>	618	GYSDDINKFLWVRIRIAGD-EHPKDLKESDYF-LDRGIEFRVDREGLPALLNCLMYKMSYRFGKLLDY	684
<i>Ehistolytica</i>	610	GYSDDINKFLWVRIRIGAGVNPS--LNENNYV--NHNAYTVIADPISDTFKYSMSYKMSYRFGKLLDY	673
<i>Scerevisiae</i>	645	Q--AIDRVRQQMIIPLDVPFLVDYDFEVTISEHNVRIYQKEDDA-----QGRITLRDVGELTRSS	702
<i>Hsapiens</i>	655	KRPPGIDRYRNAEIGNKDF-ELDDVDEGYSITTEHNLVRIYKVKLDLND-----RGLS-----	703
<i>Dmelanogaster</i>	685	RGPSIGDRIRNAVIGNKDF-DUTYLEAYTTEHWLVRIRYRVRKRPHEFNRPSSLKTKRITIPANFISRKN	752
<i>Ehistolytica</i>	674	R--AGMIAVRIREVIEEQTY--FKNIQEAFTSQRHWVYRIYKVMKNPN-----PID-----	717
<i>Scerevisiae</i>	703	TKTR-----RSIKRPELGLRV	718
<i>Hsapiens</i>	704	-----RT--	705
<i>Dmelanogaster</i>	753	SKRRKGYIRNRPVVVKGKRTLK	774
<i>Ehistolytica</i>	718	-----SLL	720

Fig. 10. Alineamiento múltiple entre secuencias STT3. Los aminoácidos que son conservados entre las proteínas STT3 de diferentes organismos se muestran en cuadros grises. La región que se utilizó como sonda para el tamizado del banco genómico se indica entre las flechas y por otro lado, la cabeza de flecha muestra la ubicación del sitio *EcoRI* dentro de la secuencia genómica.

IV.2 Análisis de Hidropaticidad de la Proteína EhSTT3

Una de las principales características de proteínas STT3 es la presencia de 12 regiones transmembranales en su estructura y un extremo COOH-terminal altamente hidrofílico [Zufferey *et al.*, 1995]. Para determinar si este patrón estructural se conserva en la proteína STT3 de *E. histolytica*, se realizaron varios análisis de hidropaticidad de la secuencia, con el fin de determinar cuántas y cuáles son las posibles regiones transmembranales para esta proteína de ameba. Para ello, la secuencia deducida para la proteína EhSTT3 se sometió a un análisis de hidropaticidad en el programa SOSUI. El resultado sugiere que la proteína presenta en su estructura 12 regiones transmembranales y despliega las secuencias que probablemente forman parte integral de las mismas (Tabla 2).

No.	N- terminal	Regiones transmembranales	C- terminal	largo
1	12	LKNGITLICIIAFSSRLYSIM	34	23
2	80	TTVFPGLMFTSAFIFKFLAYFNL	102	23
3	105	DVRLICVCMGPIYSVITCIVAYL	127	23
4	164	CISITILILTFYLWIEAVHNSP	185	23
5	206	YVFINNIPLHVLISIFCGFYN	227	22
6	233	CYSIYYIFATILSMQVPFINYVP	255	23
7	262	IGAMGVFGICQLIELYSLIHKLL	284	23
8	296	VLMGSVIIIGIMVLII	312	17
9	350	NWASYFFDLHCLIVAPAGLYYC	372	23
10	376	FDNMLFLHYSVSVFYSCVMS	398	23
11	402	LILAPAICLLSGIALAEFFTIQIQ	424	23
12	476	FIIFIIMTIVGILLIIFLKFIFE	498	23

Tabla 2. Secuencias transmembranales propuestas para la proteína STT3 de *E. histolytica*. El análisis de la secuencia polipeptídica de EhSTT3 en el programa SOSUI indica que la proteína presenta en su estructura 12 posibles regiones transmembranales, lo que sugiere que se trata de una proteína de membrana.

Por otro lado, el análisis de la distribución de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en un alineamiento de proteínas STT3 de *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *E. histolytica* muestra un alto grado de coincidencia con la predicción de las 12 regiones transmembranales que se obtuvo con el programa SOSUI (Fig. 11).

IV.3 Análisis para Determinar el Número de Copias del Gen STT3 Presentes en el Genoma de E. histolytica.

Para determinar el número de copias del gen STT3 presentes en el genoma de *E. histolytica* se realizó un ensayo tipo Southern blot. Para ello, se utilizó ADN genómico de *E. histolytica* digerido con las enzimas *AccI*, *ClaI* y *EcoRI*. La hibridación se llevó a cabo utilizando como sonda el gen *EhSTT3* (2,163 pb) amplificado por PCR a partir de DNA genómico y con los oligonucleótidos *EhSTT3.atg* y *EhSTT3.stop*.

Como resultado de la hibridación de la sonda con los fragmentos de ADN presentes en la membrana se observó que los carriles que contienen el ADN digerido con las enzimas *AccI* y *ClaI* presentan dos bandas de hibridación y sólo se esperaba una banda dado que el gen *EhSTT3* no contiene sitios de restricción *AccI* ni *ClaI* internos. Por otro lado, el carril que contiene la digestión con la enzima *EcoRI* presenta tres bandas de hibridación. En este caso esperábamos dos bandas dado que este gen presenta en su secuencia un sitio de reconocimiento por la enzima *EcoRI* en donde una de ellas era de tamaño conocido (~3.8 Kb) dado que corresponde al inserto presente en las clonas aisladas a partir del tamizado del banco genómico. Por lo tanto, los resultados sugieren que el genoma de *E. histolytica* presenta dos copias del gen *EhSTT3* (Fig. 12a).

IV.4 Transcripción del Gen EhSTT3

Para analizar la expresión del gen *EhSTT3* se realizó un ensayo tipo Northern blot. Para ello, se utilizó ARN mensajero poli A (+) y poliA (-) y como sonda se empleó un fragmento de ~1.2 Kb que corresponden al extremo 5' del gen *EhSTT3*. Los resultados del Northern blot muestran que el ADN hibridó con una sola banda, lo que indica que este gen se expresa como transcrito único con un peso molecular aproximado de 2.2 Kb (Fig. 12b).

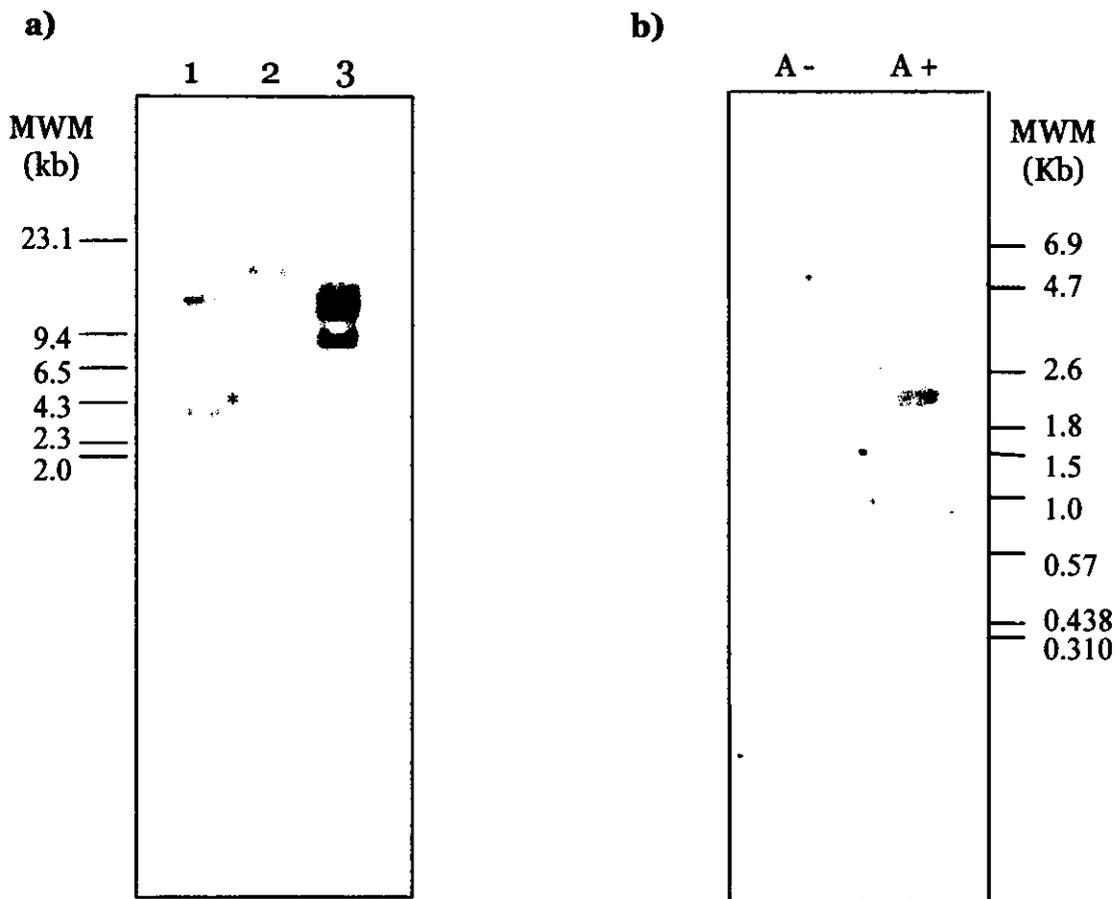


Figura 12. Organización genómica y transcripción del gen *EhSTT3*. a) Southern blot. El ADN total de *E. histolytica* (4 µg/carril) se digirió con las enzimas de restricción: 1) *EcoRI*, 2) *ClaI* y 3) *AccI*. Posteriormente, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1% y se transfirió a una membrana de nylon. La hibridación se llevó a cabo con la secuencia genómica de *EhSTT3*. Con un asterisco se marca la banda de 3.8 Kb que corresponde al fragmento que se aisló a partir del tamizado del banco genómico. b) Northern blot. Tanto ARN poli A+ como poli A- (1 µg/carril) se sometieron a electroforesis en un gel de 1.2% agarosa-2.2 M formaldehído y se transfirieron a membrana al igual que el Southern blot. Como sonda se utilizó un fragmento de ~1.2 Kb que corresponde al extremo 5' del gen *EhSTT3*.

IV.5 Obtención de Anticuerpos Policlonales Contra la Proteína EhSTT3

IV.5.1 Expresión de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-EhSTT3

La proteína EhSTT3 se expresó en *E. coli* como proteína de fusión a 6xHis-DHFR presentes en el extremo NH₂-terminal (Fig. 14 y 15a). Para ello, se generó por restricción del producto de la técnica 3' RACE un segmento de 366 pb que codifica para una región de la proteína EhSTT3 altamente hidrofílica, de acuerdo con un análisis hidropático de la proteína realizado en el programa Tmpred (Fig. 13). Esta región se clonó en el vector pQE40 y como producto de esta clonación se aislaron 7 clonas que contienen el vector más el inserto de interés. La expresión de la proteína se llevó a cabo por inducción del promotor con 1 mM final de IPTG durante 2 hrs y el análisis de la misma se realizó en un gel SDS-PAGE al 15% a partir de lisados totales. Como control de la expresión se analizaron lisados totales de cada una de las 7 clonas que no fueron previamente inducidas con IPTG y que se trataron bajo las mismas condiciones. Los resultados muestran que las siete clonas expresan una proteína de aproximadamente 37 kDa que corresponde al peso molecular esperado para la proteína de fusión 6xHis-DHFR-EhSTT3. La figura 15a muestra la expresión de la proteína recombinante de una de las clonas con la que se decidió continuar el estudio.

IV.5.2 Purificación de la Proteína Recombinante 6xHis-DHFR-EhSTT3

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo por cromatografía de afinidad sobre una matriz de agarosa Ni-NTA que presenta afinidad por moléculas etiquetadas con 6 histidinas consecutivas. Para ello, las células que contienen la proteína de fusión se lisaron en condiciones desnaturizantes en presencia de 8 M urea. Posteriormente, el clarificado se incubó con la agarosa Ni-NTA para permitir el acoplamiento de la proteína a la resina y por último, se realizó la elución de la proteína recombinante con 250 mM imidazol. Una vez que se colectaron las fracciones de interés, se determinó su concentración y se procedió a su análisis en un gel 15% SDS-PAGE. Este análisis reveló que las fracciones que se colectaron contienen una proteína de ~37 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína de fusión (Fig. 15b). El rendimiento que se obtuvo fue de 2 mg/ml de la proteína recombinante a partir de 500 ml de cultivo.

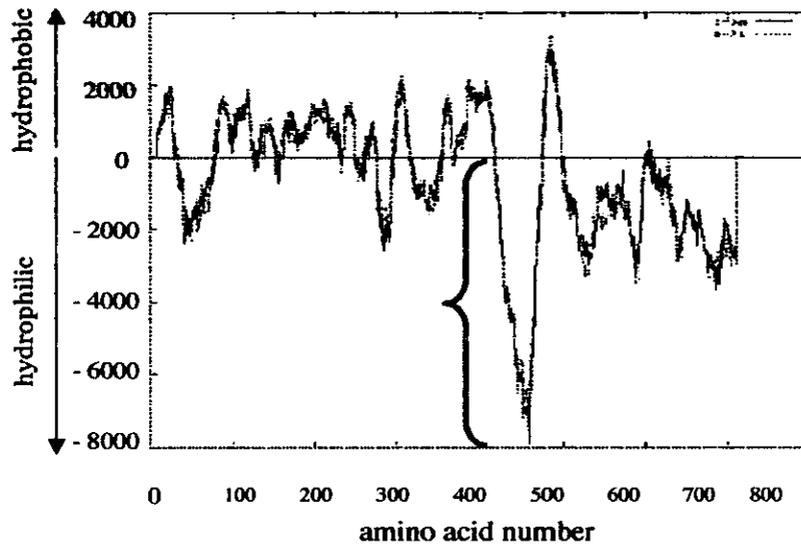


Fig. 13. Análisis hidropático de la secuencia polipeptídica de la proteína *EhSTT3*. Este análisis se llevó a cabo en el programa Hydropaty profile del paquete GeneWorks. Los resultados muestran una región altamente hidrofílica misma que se clonó en pQE40 y se expresó en *E. coli*.

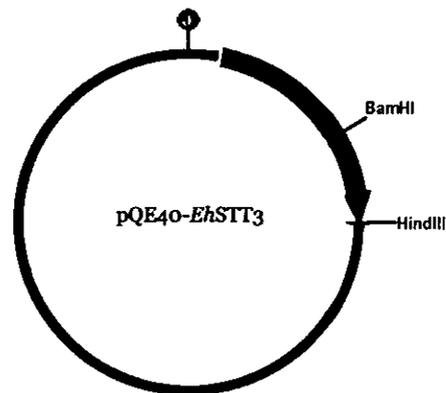


Fig. 14. Clonación de un fragmento de 366 pb del gen *EhSTT3* (azul marino, flanqueado por los sitios de restricción BamHI-HindIII) en pQE40. Este fragmento se expresó en *E. coli* como proteína de fusión a 6xHis-DHFR presentes en el extremo NH₂-terminal (representados en amarillo y azul claro, respectivamente).

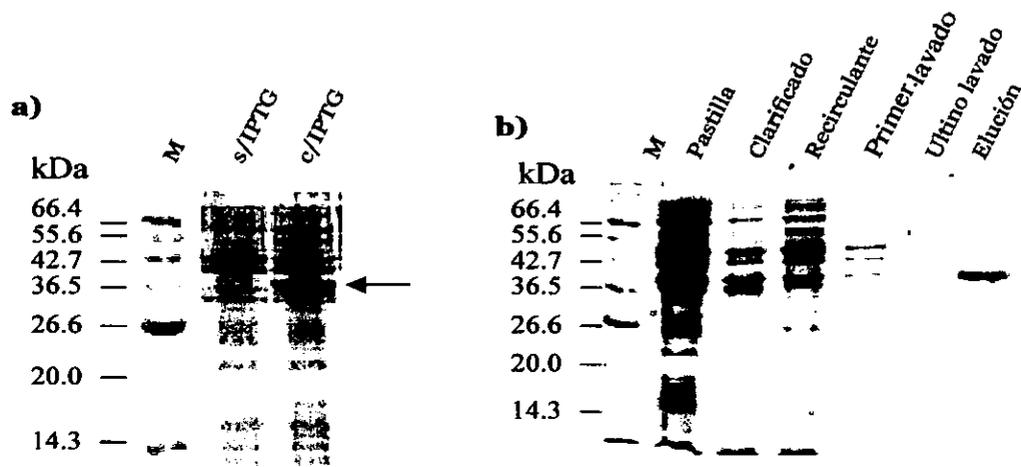


Fig. 15. Análisis electroforético de la expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*EhSTT3*. a) Lisados totales de la clona 10 incubada en presencia de IPTG (c/IPTG) o ausencia (s/IPTG). El carril que contiene la muestra inducida con IPTG presenta una banda que corresponde a una proteína del peso molecular esperado ~37 kDa que no se observa en el control sin inducir. b) Análisis de las fracciones colectadas durante la cromatografía sobre agarosa Ni-NTA. El carril de elución muestra el grado de pureza de la proteína recombinante.

IV.6 Obtención de Anticuerpos Policlonales anti-*EhSTT3*

Para generar anticuerpos policlonales contra la proteína STT3 de *E. histolytica* se llevó a cabo la inmunización de un conejo empleando como antígeno 100 µg de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*EhSTT3* previamente purificada. La inmunización de este conejo se llevó a cabo cada 15 días durante tres meses y la respuesta inmunitaria del mismo hacia el antígeno se monitoreó por el método de ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA con la proteína 6xHis-DHFR y 6xHis-DHFR-STT3 y se incubaron tanto con el suero preinmune como con el suero hiperinmune. La diferencia entre la detección de la proteína 6xHis-DHFR y la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*EhSTT3* determina la respuesta inmune específica contra la proteína de interés. Por lo tanto, los títulos que se generaron contra la proteína *EhSTT3* al momento de la última sangría fueron de 1:35,240.

Los anticuerpos anti-*EhSTT3* específicos se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad sobre una columna de sefarosa 4B acoplada a 6xHis-DHFR-*EhSTT3*. Para separar aquellos anticuerpos que reconocen a la proteína 6xHis-DHFR de los que reaccionan contra la región *EhSTT3* se llevó a cabo la pre-adsorción de los sueros en una

columna de sefarosa 4B acoplada a 6xHis-DHFR. Como resultado de la cromatografía se purificaron anticuerpos anti-*EhSTT3* a una concentración de 80 µg/ml a partir de 15 ml de suero hiperinmune.

IV.7 Caracterización de los anticuerpos anti-EhSTT3

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-*EhSTT3* a partir de lisados totales de *E. histolytica*, se llevó a cabo un ensayo tipo Western blot. Para ello, se analizaron lisados equivalentes a 100,000 y 50,000 amibas y como control se incluyeron muestras de 100 y 50 ng de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-*EhSTT3* y de la proteína 6xHis-DHFR. Todas las muestras se sometieron a electroforesis en un gel 15% SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana. Para llevar a cabo el reconocimiento primario se utilizó 1 µg/ml del anticuerpo anti-*EhSTT3* previamente purificado. El reveló que los anticuerpos anti-*EhSTT3* reconocen a una proteína en *E. histolytica* de aproximadamente 65 kDa. Igualmente, los anticuerpos reconocen a la proteína recombinante empleada como antígeno (~37 kDa) y por otro lado, no reconocen a la proteína 6xHis-DHFR (~26 kDa), lo que indica que los anticuerpos que se purificaron son específicos para *EhSTT3* (Fig. 16). Es importante señalar que la proteína *EhSTT3* tiene un peso molecular teórico de 82.7 kDa y que a través del ensayo Western blot se observa que los anticuerpos anti-*EhSTT3* reconocen a una proteína de ~65 kDa, resultado que no es de sorprender dado que se ha reportado que esta proteína migra anómalamente en geles SDS-PAGE por lo que se ha llegado a observar como una banda de ~60 kDa [Karaoglu *et al.*, 1997; Spiring *et al.*, 1997].

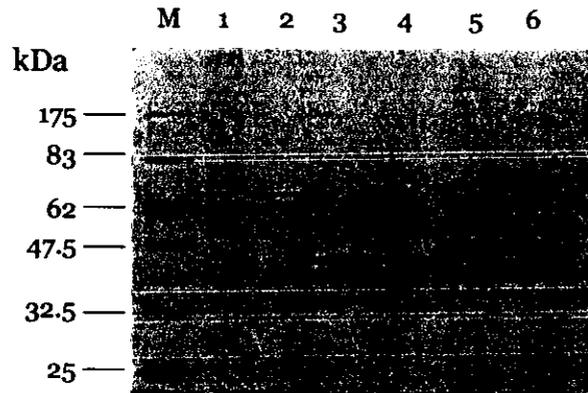


Fig. 16. Reconocimiento de los anticuerpos purificados por cromatografía de inmunoafinidad. El carril 1 y 2 contienen lisados totales de 100,000 y 50,000 amibas respectivamente. En los carriles 3 y 4 se cargaron 100 y 50 ng de proteína recombinante y por ultimo, los carriles 5 y 6 contienen 100 y 50 ng de la proteína 6xHis-DHFR. Como puede observarse, los anticuerpos son específicos para la proteína *EhSTT3* (carriles 1 y 2). Por otro lado, los anticuerpos reconocen a la proteína recombinante empleada como antígeno (carriles 3 y 4) y no contra la proteína 6xHis-DHFR (carriles 5 y 6).

IV.8 Localización Intracelular de la Proteína STT3 en E. histolytica

Una vez confirmada la especificidad de los anticuerpos anti-*EhSTT3* por ensayo Western blot, se procedió a realizar la citolocalización de la proteína *STT3* en trofozoitos de *E. histolytica* por inmunofluorescencia. Para ello, trofozoitos de *E. histolytica* se incubaron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-*EhSTT3*. También, se realizaron co-tinciones de ADN con Ioduro de Propidio para observar núcleo. Las muestras se analizaron en el microscopio confocal y se procesaron en el programa VoxelView que permite la reconstrucción de volúmenes en 3D. Al analizar las imágenes se observó que gran parte de la señal específica de la proteína *EhSTT3* se encuentra distribuida a lo largo de todo el citoplasma pero además, se aprecia una señal de alta intensidad en el núcleo dado que co-localiza con el Ioduro de Propidio (Fig. 17 y 18).

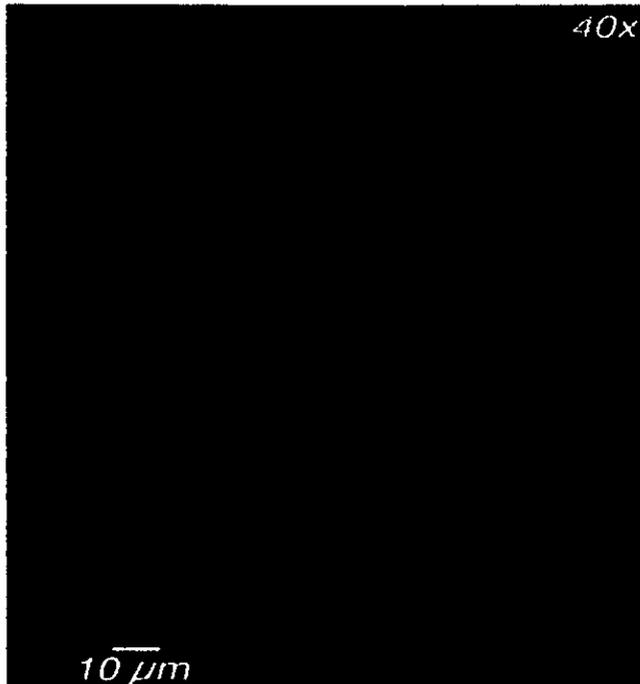


Fig. 17. Inmunocitocalización de la proteína *EhSTT3* en trofozoitos de *E. histolytica*. La señal de la proteína presente tanto en el citoplasma como en el núcleo es representativa puesto que se observa en todas las células.

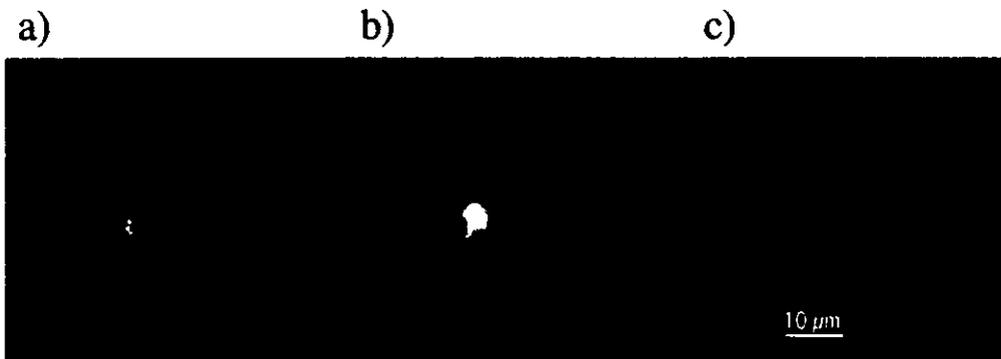


Fig. 18. La presente figura muestra varios cortes transversales pasando a través del núcleo de las células para determinar la citocalización de la proteína *STT3* en *Entamoeba histica*. a) distribución intracelular de la proteína *STT3* en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. b) señal que corresponde al núcleo generada por tinción de ADN con Ioduro de Propidio y por último, c) superposición de ambas imágenes: en rojo se muestra el núcleo y en verde la señal de la proteína *EhSTT3*. Como puede notarse, dentro del núcleo se observa una región que no se tiñe con Ioduro de Propidio y que al momento de hacer la sobreposición de las dos primeras imágenes, esta región está ocupada por la proteína *EhSTT3*.

V. DISCUSIÓN

El principal interés de nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la clonación y caracterización de genes amibianos que codifican para proteínas que juegan un papel clave en la vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas en células eucariotes típicas. Estas proteínas serán empleadas como marcadores moleculares que nos permitirán determinar cuáles son los equivalentes funcionales de retículo endoplásmico y aparato de Golgi en *E. histolytica*. Uno de los genes que resulta de nuestro interés se clonó en el presente trabajo y codifica para la proteína *EhSTT3*, una subunidad del complejo oligosacaryltransferasa (OSTasa), responsable de la N-glicosilación de proteínas en células eucariotes [Zufferey *et al.*, 1995; Spirig, *et al.*, 1997].

El gen *EhSTT3* se aisló a partir del tamizado de un banco genómico de *E. histolytica* y se complementó por el método 3'-RACE. Esta secuencia presenta un marco abierto de lectura de 2,163 pb que codifica para una proteína de 720 aminoácidos cuyo peso molecular teórico es de 82.7 kDa, consistente con el peso molecular promedio de proteínas STT3. Una de las principales características del genoma de *E. histolytica* es la presencia de un alto contenido de A y T (68%) en secuencias codificantes [Gelderman *et al.*, 1971; Tannich y Horstmann, 1992]. En el caso de la secuencia que codifica para la proteína *EhSTT3*, la composición de bases corresponde en un 74% a los nucleótidos A+T y en un 26% a los nucleótidos C+G, con un uso preferencial de A/T en la tercera posición. La confrontación entre la secuencia genómica y la tabla de uso preferencial de codones de *E. histolytica* mostró que la secuencia obtenida presenta, como se esperaba, un uso preferencial de codones de este parásito conservado en el primer marco abierto de lectura, lo que confirma su origen amibiano.

Como parte de la caracterización del gen *EhSTT3* se identificó por homología de secuencia una caja TATA putativa, TATTAAA, ubicada a -87 pb del sitio de inicio de la transcripción. También se caracterizaron los extremos 5' y 3' no traducidos del ARN mensajero del gen *EhSTT3* por medio de la técnica 5' y 3'-RACE. Los extremos 5' y 3' no traducidos de ARN mensajeros de *E. histolytica* se caracterizan por ser extremadamente cortos [Bruchhaus *et al.*, 1993]. En el caso del transcrito del gen *EhSTT3* los extremos 5' y 3' no traducidos son de 10 nt y 31 nt de largo, respectivamente, resultado que confirma lo descrito anteriormente. La secuencia de inicio de la transcripción AATA ubicada en

la posición -10 difiere de las secuencias consenso ATCA ó ATTCA reportadas para *E. histolytica* [Bruchhaus *et al.*, 1993]. Por otro lado, la secuencia que marca el término de la transcripción TAATT, localizada en la posición 2,187, coincide con la secuencia reportada TA[^]/_TTT [Bruchhaus *et al.*, 1993]. También, se observó que el ARN mensajero del gen *EhSTT3* es modificado co-transcripcionalmente por "capping". El "capping" es un proceso casi no estudiado en *E. histolytica*; sin embargo, en el laboratorio se ha observado la presencia de un nucleótido G en el extremo 5' de los transcritos de los genes SEC61, ERD2, RAB8 y YAK1, no presente en las secuencias genómicas. El transcrito *EhSTT3* también es poliadenilado, un fenómeno frecuentemente observado en ARN mensajeros de *E. histolytica* [Tannich *et al.*, 1993].

La identidad de la proteína *EhSTT3* con secuencias homólogas es de 37% a 41%. El porcentaje de menor identidad se observó con *D. melanogaster* y el de mayor identidad se observó con *H. sapiens*, lo que confirma que la proteína *EhSTT3* está altamente conservada a lo largo de la evolución. El alto grado de conservación de esta proteína puede ser un indicativo del compromiso funcional de la misma en la actividad oligosacaryltransferasa (OSTasa). En los últimos años, diversos estudios han generado evidencia de que el proceso de *N*-glicosilación está conservado desde bacterias hasta eucariotes superiores. Una de las evidencias está basada en que la proteína STT3 de *S. cerevisiae* presenta homología tanto de secuencia como de estructura con una proteína arqueal [Lechner y Wieland, 1989].

La secuencia primaria de la proteína *EhSTT3* se sometió a varios análisis de hidropaticidad que coinciden en que esta proteína presenta en su secuencia 12 regiones altamente hidrofóbicas. Este resultado sugiere que la proteína *EhSTT3* es una proteína de membrana con 12 regiones transmembranales en su estructura al igual que proteínas homólogas.

Para determinar el número de copias del gen *EhSTT3* presentes en el genoma de *E. histolytica* se llevó a cabo un Southern blot, empleando ADN genómico digerido con las enzimas *AccI*, *ClaI* y *EcoRI* y como sonda, la secuencia genómica que codifica para la proteína *EhSTT3* identificada en este trabajo. Los resultados sugieren que el genoma de *E. histolytica* presenta dos copias del gen *EhSTT3*.

De antemano conocíamos que el gen *EhSTT3* se expresa en *E. histolytica* dado que un fragmento del mismo fue reportado como EST [Tanaka *et al.*, 1997]. Sin embargo, para conocer el tamaño del transcrito se llevó a cabo un Northern blot utilizando como sonda un fragmento de 1.2 Kb correspondiente al extremo 5' del gen *EhSTT3*. Los resultados indican que este gen se expresa como transcrito único de aproximadamente 2.2 Kb. Si la hipótesis de que existen dos copias del gen *EhSTT3*, es probable que sólo uno de ellos se está transcribiendo, o se transcriben ambos, pero los dos transcritos son del mismo tamaño.

Para obtener anticuerpos anti-*EhSTT3* y poder determinar la localización intracelular de la proteína *EhSTT3* se llevó a cabo la expresión de un fragmento de la proteína *EhSTT3* recombinante en *E. coli*. Una de las características de este fragmento es que corresponde a una región altamente hidrofílica de la proteína que facilita la obtención de anticuerpos contra la misma dado que la hidrofiliidad es una propiedad que favorece su antigenicidad. Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad y la especificidad de los mismos se determinó por ensayo tipo Western blot a partir de lisados totales de trofozoitos de *E. histolytica*. Este resultado mostró que los anticuerpos reconocen a una proteína de ~65 kDa. A pesar de que la proteína *EhSTT3* tiene un peso molecular teórico de 82.7 kDa se ha observado en células de levadura que en geles SDS-PAGE migra anómalamente como una proteína de ~60 kDa [Karaoglu *et al.*, 1997; Spiring *et al.*, 1997], por lo que, no es de sorprender que los anticuerpos reconozcan en amiba una proteína con una movilidad relativa menor a la esperada.

Las proteína STT3 de levadura es una proteína de membrana de RE que forma parte del complejo oligosacariltransferasa, responsable de la N-glicosilación de proteínas [Zuferey *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995]. La localización intracelular de esta proteína se ha estudiado principalmente con mutantes termosensibles [Zuferey *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995]. La citolocalización de la proteína *EhSTT3* en trofozoitos de *E. histolytica* se llevó a cabo por microscopia confocal inmunofluorescente utilizando los anticuerpos específicos anti-*EhSTT3*. Los resultados muestran que parte de la señal correspondiente a la proteína *EhSTT3* se encuentra localizada de manera difusa a lo largo de todo el citoplasma; sin embargo, la señal de mayor intensidad se observó concentrada en una cierta región del núcleo dado que co-localiza con el

colorante yoduro de propidio. Es importante señalar que en los últimos años diversos estudios sugieren que el nucleoplasma de células de mamífero [Fricker *et al.*, 1997], plantas [Collings *et al.*, 2000], insectos [Hochstrasser y Sedat, 1987], entre otros, contiene estructuras de doble membrana con un amplio rango de morfologías como invaginaciones ó canales cuyo espacio intermembranal presenta proteínas residentes de RE como la proteína disulfuro isomerasa, una proteína residente del lumen del RE [Fricker *et al.*, 1997]. En el caso de *E. histolytica*, la proteína *EhSTT3* puede estar localizada en este tipo de estructuras que pudieran servir de base en las diferentes etapas del proceso de *N*-glicosilación de proteínas y que posiblemente, corresponden al equivalente funcional de retículo endoplásmico en este parásito. La co-localización de otros marcadores moleculares de RE como la proteína SEC61, PDI, ERD2 y SRP54 de amiba con la proteína *EhSTT3* nos permitirá especular con mayor certeza acerca de cómo se encuentra organizada la vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas en *E. histolytica*. Por otro lado, los anticuerpos generados en el presente trabajo son una herramienta útil para la caracterización de fracciones subcelulares enriquecidas con este marcador, así como para analizar la morfología de cada fracción por inmunomicroscopía electrónica.

VI. CONCLUSIONES

- 1) Como una de las primeras evidencias moleculares de la existencia de un posible mecanismo de *N*-glicosilación de proteínas destinadas a la vía de tráfico intracelular y secreción de proteínas, se clonó el gen que codifica para la proteína STT3 de *E. histolytica*, una subunidad del complejo oligosacariltransferasa. Este gen presenta un marco abierto de lectura de 2,163 pb que codifica para una proteína de 82.7 kDa.
- 2) La proteína *EhSTT3* presenta una identidad entre 37% y 41% con secuencias homólogas. Este alto grado de conservación puede ser un indicativo del compromiso funcional de la proteína en la actividad oligosacariltransferasa (OSTasa).
- 3) Diversos análisis de hidropaticidad mostraron que la proteína *EhSTT3* presenta en su secuencia 12 regiones altamente hidrofóbicas que coinciden con las regiones transmembranales identificadas para proteínas homólogas, por lo que podría tratarse de una proteína de membrana.
- 4) El análisis tipo Southern blot sugiere que en el genoma de *E. histolytica* presenta dos copias del gen *EhSTT3*. Por otro lado, el estudio de Northern blot indica que el gen *EhSTT3* se expresa como transcrito único de aproximadamente 2.2 Kb.
- 5) La localización intracelular de la proteína *EhSTT3* se observó principalmente en el núcleo el cual, probablemente esté asociado físicamente a estructuras involucradas en el proceso de *N*-glicosilación de proteínas.

VII. APENDICE

VII.I Medios de Cultivo (1 L)

I. LB

NaCl	10 g
Bacto triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Bacto-agar en caso de medio sólido	15 g
Autoclavear 20 min a 120°C	

II. SOC

Triptona	20 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	0.58 g
KCl	0.19 g
En condiciones estériles se le adicionó lo siguiente:	
MgCl ₂ 1M	10 ml
MgSO ₄ 1M	10 ml
Glucosa 20% esterilizada por filtración.	

III. BI-S-33 [Diamond *et al.*, 1978]

Peptona de Biotriptasa	3.65%
Dextrosa	1.21%
NaCl	1.24%
KH ₂ PO ₄	0.07%
K ₂ HPO ₄	0.12%
L cisteína hidroclicorada	0.012%
Ácido ascórbico	0.024%
Citrato de amonio férrico	0.0057%

Después de esterilizar se adiciona 15% de suero de ternera (inactivado) y 3% de vitaminas-Tween 80.

IV. NZY

NaCl	5 g
MgSO ₄	5 g
Ext. de Levadura	5 g
Peptona de Caseína	10 g
Agar en caso de medio sólido	15 g
Agar suave	1.4 g

VII.2 Reacciones de PCR

Para una reacción de 100 μ l se emplearon los siguientes componentes:

2,5 mM dNTP's	8 μ l
Amortiguador de reacción	10 μ l
Oligonucleótidos	20 μ moles
Templado	A consideración según sea el caso.
5 U/ μ l Taq DNA polimerasa	0.8 μ l
Agua estéril	El volumen necesario para aforar 100 μ l.

La reacción se llevó a cabo en un Perkin-Elmer Cetus 9600 empleando el siguiente programa de ciclos:

1 ciclo	Temperatura de desnaturalización	94°C	1 min
30 ciclos	Temperatura de desnaturalización	94°C	1 min
	Temperatura de apareamiento	42°C / 50°C	2 min
	Temperatura de polimerización	72°C	3 min
1 ciclo	Temperatura de polimerización	72°C	7 min

VII.3 Plásmidos empleados

pBSSK (-) (pBluescript SK -, Stratagene), un vector de 2,958 pb empleado en la clonación de fragmentos de ADN para su secuenciación.

pQE40 (QIAGEN), un vector de 4,003 pb utilizado para la expresión de la proteína *EhSTT3* recombinante.

VII.4 Secuencias de Oligonucleótidos

I. Oligos específicos de el gen *EhSTT3*

<i>EhSTT3.5a2</i>	5'- ATT AAA ATA TGG ATC AAA TTC -3'
<i>EhSTT3.atg</i>	5'- T <u>GGA TCC</u> GGT TTC TTT AAA ACA CTT GT -3'
<i>EhSTT3.stop</i>	5'- A AAG TAA TGA ATC AAT TGG AT -3'
<i>EhSTT3.E1s</i>	5'- C <u>GGA TCC</u> TGG GAT TAT GGT TAT CAA ATA -3'
<i>EhSTT3.E2s</i>	5'- C <u>GGA TCC</u> GAT ATT AAT AAA TTC TTA TGG -3'
<i>EhSTT3.5a</i>	5'- AAA CAT ATG CTC CCC ATG -3'
<i>EhSTT3.1s</i>	5`-TTC TTG GAT CTT CAT TGT TTA-3`
<i>EhSTT3.2s</i>	5`-CGC <u>GGA TCC</u> TTA CTT AGT GGT ATT GCT CTT-3`
<i>EhSTT3.2a</i>	5`-AAG AGC AAT ACC ACT AAG TAA-3`

Las secuencias subrayadas corresponden a sitios *Bam*HI.

II. Oligos universales de pBSSK (-)

SK	5'- CGC TCA GAA CTA GTG GATC -3'
KS	5'- TCG AGG TCG ACG GTA CT -3'
Reverse	5'- GGA AAC AGC TAT GAC CAT G -3'

Oligos empleados en la técnica 5' y 3' RACE

Oligo AUAP-B	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(C) ₁₇ <u>GGA TCC</u> -3'
Oligo dC	5'- (C) ₁₂ -3'

VIII. REFERENCIAS

- Abeijon, C. y Hirschberg, C.** Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 1992. 17:32-36.
- Aley, S., Scott, W. y Cohn, Z.** Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980. 152:391-404.
- Arroyo, R. y Orozco, E.** Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol* 1987. 23(2):151-158.
- Arvan, P. y Castle, D.** Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* 1998. 332:593-610.
- Bannykh, S., Rowe, T. y Balch, W.** The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 1996. 135:19-35.
- Bannykh, S., Nishimura, N. y Balch, W.** Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* 1998. 8:21-25.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M., Ravazzola, M., Amherdt, M. y Sheckman, R.** COP II: a membrane coat formed by sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994. 77:895-907.
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, L. y Soldo, A.** Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozol* 1989. 36:455-458.
- Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A. y Bhattacharya, S.** The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 2000. 30:401-410.
- Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, M. y Tannich, E.** Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol* 1993. 12:925-933.
- Burda, P. y Aebi, M.** The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim et Biophys Acta* 1999. 1426:239-257.

- Caballero-Salcedo, A., Viveros, R., Salvatierra, B., Tapia-Conyer, R., Sepúlveda-Amor, J., Gutiérrez, G., Ortiz-Ortiz, L.** Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1994. 50(4):412-419.
- Collins, D., Carter, C., Rink, J., Scott, A., Wyatt, S. y Stromgren, N.** Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *The plant cell* 2000. 12:2425-2439.
- Corsi, A. y Scheckman, R.** Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996. 271:30299-30302.
- Crowley, K., Liao, S., Worrell, V., Reinhart, G. y Johnson, A.** Secretory proteins move through the ER membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 1994. 78:461-471.
- Diamond, L., Harlow, D. y Cunnick, C.** A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978. 72:431-432.
- Dunphy, P., Kerr, J., Pennock, J., Whittle, J. y Feeney, J.** *Biochim Biophys Acta* 1967. 136:136-147.
- Ellgaard, L., Molinari, M. y Helenius, A.** Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 1999. 286:1882-1888.
- Fricke, M., Hollinshead, M., White, N. y Vaux, D.** Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1997. 136(3):531-544.
- Gelderman, A., Bartig, I., Keister, D. y Diamond, L.** A comparison of genome sizes and thermal denaturation derived based composition of DNAs from several members of *Entamoeba (histolytica group)*. *J Parasitol* 1971. 57:912-916.
- Gething, M.** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Cell Dev Biol* 1999. 10: 465-472.

- Ghosh, S., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. y Samuelson, J.** Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Infec Immun* 1999. 67(6):3073-3081.
- Görlich, D. y Rapoport, T.** Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 1993. 75:615-630.
- Gough, D. y Hemming, F.** *Biochem J* 1970. 118:163-166.
- Hubber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Ravel, M., Rosenblatt, S. y Gaarfinkel, L.** *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* 1989. 32:285-296.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. y Rapoport, T.** Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 1994. 367:654-657.
- Hirschberg, C. y Snider, M.** Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann Rev Biochem* 1987. 56:63-87.
- Hubber, M., Koller, B., Gitler, C., Mirelman, D., Ravel, M., Rozenblatt, S. y Garfinkel, L.** *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol* 1989. 32:285-296.
- Imperiali, B., Shannon, H., Unno, M., Rickert, K.** A mechanistic proposal for asparagine-linked glycosylation. *J Am Chem Soc* 1992. 114:7944-7945.
- Johnson, A. y van Waes, M.** The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Biol* 1999. 15:799-842.
- Juárez, P., Sánchez-López, R., Ramos, M., Stock, R. y Alagón, A.** Rab 8 as a molecular model of vesicular trafficking to investigate the latter steps of the secretory pathway in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 2000. 31 (4):S157-S159.

- Karaoglu, D., Kelleher, D. y Gilmore, R.** J Biol Chem 1997. 272:32513-32520.
- Knauer, R. y Lehle, L.** Biochim Biophys Acta 1999. 1426:259-273.
- Kornfeld, R. y Kornfeld, S.** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann Rev Biochem 1985. 54:631-664.
- Kukuruzinska, M., Robbins, P.** protein glycosylation in yeast::transcript heterogeneity of the ALG7 gene. Proc Natl Acad Sci 1987. 84:2145-2149.
- Ladinsky, M., Mastronarde, D., McIntosh, J., Howell, K. y Staehelin, L.** Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. J Cell Biol 1999. 144:1135-1149.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O., Horstmann, R. y Muller-Ebenhard, H.** Pore forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 1991. 88(17):7659-7663.
- Lohia, A. y Samuelson, J.** Cloning of the *Eh cdc2* gene from *Entamoeba histolytica* encoding a protein kinase p^{34cd2} homologue. Gene 1993. 127:203-207.
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T. y Dobberstein, B.** Signal sequence processing in rough microsomes. J Biol Chem 1995. 270:19873-19878.
- Marcus, N., Shaffer, D., Farrar, P. y Green, M.** Tissue distribution of three members of the murine protein disulfide isomerase (PDI) family. Biochim Biophys Acta 1996. 1309: 253-260.
- Martínez-Menárguez, J., Geuze, H., Slot, J. y Klumperman, J.** Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. Cell 1999. 98:81-90.
- Martínez-Palomo, A.** Biology of *Entamoeba histolytica*. En "Amebiasis". Martínez-Palomo, A. (Editor) 1986. Elsevier, Amsterdam. Human Parasitic Series 2. Pags:11:43. (17):7659-7663.

- Martínez-Palomo, A.** Parasitic amebas of the intestinal tract. En "Parasitic Protozoa". Krierer, J. y Baker, J. (Editores) 1993. Academic Press, New York. 2 nd Edition. Pags: 66-141.
- Mazzuco, A., Benchimol, M. y De Souza, W.** Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* 1997. 28 (3):241-247.
- Mellman, I. y Warren, G.** The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 2000. 100:99-112.
- Orci, L., Halban, P., Amherdt, M., Ravazzola, M., Vassalli, J. y Perrelet, A.** A clathrin-coated, Golgi-related compartment of the insulin secreting cell accumulates proinsulin in the presence of monensin. *Cell* 1984. 1:39-47.
- Orlean, P., Albright, C. y Robbins, P.** Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, and essential protein. *J Biol Chem* 1998. 273:17499-17507.
- Palade, G.** Intracellular aspects on the process of protein synthesis. *Science* 1975. 189:347-358.
- Parodi, A. y Leloir, L.** *Biochim Biophys Acta* 1979. 599:1-37.
- Pérez-Monfort, R. y Saavedra-Lira, E.** Cloning and sequence determination of the gene coding for the pyruvate phosphate dikinase of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 1994. 142:259-251.
- Petri, W. y Chapman, M., Snodgrass, T., Mann, B., Broman, J. y Ravdin, J.** Subunit structure of the galactose and *N*-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* 1989. 264 (5):3007-3012.
- Radomska-Pyrek, A., Chojnacki, T. Pyrek, J.** *Biochem Biophys Res Commun* 1979. 86:395-401.

- Ramos M, Mercado G, Salgado L, Sánchez-López R, Stock R, Lizardi P y Alagón A.** *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol Biochem Parasitol* 1997. 88:225-235.
- Ramos, M. y Alagón, A.** Molecular cloning of a gene encoding a PDI-like protein from *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 2000. 31 (4):S173-S175.
- Reiss, G., te Heesen, S., Gilmore, R., Zufferey, R. Aebi, M.** *EMBO J* 1997. 16:1164-1172.
- Rosales-Encina, J., Meza, I., López de León, A., Talamás-Rohana, P., Rojkind, M.** Isolation of a 220 kDa protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1987. 156(5):790-797.
- Sakaguchi, M.** Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotech* 1997. 8:595-601.
- Sánchez-López, Gamma-Castro, S. Ramos, M., Merino, E., Lizardi, P. y Alagón, A.** Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol* 1998. 92 (2):355-359.
- Sánchez-López, R., Siminovich, B. y Alagón, A.** *Entamoeba histolytica* codes for a protein homologue of the Sec61 alpha subunit, a component of the endoplasmic reticulum translocon. *Arch Med Res* 2000. 31 (4):S168-S170.
- Short, B. y Barr. F.** The Golgi apparatus. *Curr Biol* 2000. 10(16):R583-5.
- Spiring, U., Glaras, M., Bodmer, D., Reiss, G., Burda, P., Lip-puner, V., te Heesen, S. Aebi, M.** *Mol Gen Gene* 1997. 256:628-237.
- Stanley, S., Huizenga, H. y Li, E.** Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1992. 50(1):127-138.
- Tanaka, T., Tanaka, M. y Mitsui, Y.** Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of the parasitic protozoa *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997. 236:611.

- Tannich, E. y Horstmann, R.** Codon usage in pathogenic *Entamoeba histolytica*. *L Mol Evol* 1992. 34(3):272-273.
- te Heesen, L., Lehle, A., Weissmann, A. y Aebi, M.** Isolation of the ALG5 locus encoding the UDP-glucose:dolichyl-phosphate glucosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur J Biochem* 1997. 224:71-79.
- Torres-Guerrero, H., Peattie, D. y Meza, I.** Chromatin organization in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1991. 45(1):121-130.
- Tooze, S., Tooze, J. y Warren, G.** Site of addition of *N*-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J Cell Biol* 1988. 106:1475-1487.
- Urban, B., Blasig, C. Forster, B., Hamelman, C., Horstmann, R.** Putative serine/threonine protein kinase expressed in complement resistant forms of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1996. 80:171-178.
- Valdés, J., De la Cruz-Hernández, F. Ocadiz, R. y Orozco, E.** Molecular karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990. 84(4):537-541.
- Vargas-Rodríguez, L., Vallagómez-Castro, J., Flores-Carreón, A. y López-Romero, E.** Identification and characterization of early reactions of asparagine-linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 1998. 28(9):1333-1340.
- Villagómez-Castro, J. Calvo-Mendez, C., Vargaz-Rodríguez, L., Flores-Carreón, A. y Lopez-Romero, E.** *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp Parasitol* 1998. 88(2):111-120.
- Walsh, J.** Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infec Dis* 1986. 8:228-238.
- Walter, P. y Blobel, G.** *Nature* 1982. 299:691-698.

Walter, P. y Johnson, A. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 1994. 10:87-119.

Yoshida, S., Ikeda, E., Uno, I., Mitsuzawa, H. *Mol Gen Genet* 1992. 231:337-344.

Yoshida, S., Ohya, Y., Nakano, A. y Anraku, Y. STT3, a novel essential gene related to the PKC1/STT1 protein kinase pathway, is involved in protein glycosylation in yeast. *Gene* 1995. 164:167-172.

Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te Hessen, S., Lehle, L. y Aebi, M. STT3 a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity in vivo. *EMBO J* 1995. 14:4949-4960.