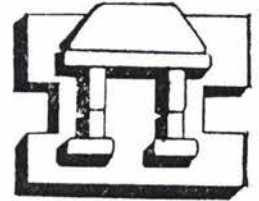




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EXPRESION DE LA PROTEINA VERDE
FLUORESCENTE ASI COMO DE LA QUIMERA
CONTENIENDO LA SECUENCIA KDEL EN

Entamoeba histolytica

T E S I S

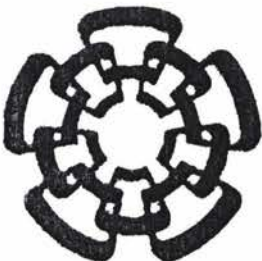
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DAVID ESAU FRAGOSO FONSECA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. REBECA G. MANNING CELA



2002



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.



U.N.A.M. FES
IZTACALA

AGREDECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han estado conmigo ya que sin su interés cariño y confianza no hubiese llegado hasta aquí, principalmente a mi familia que es lo más importante que tengo y que sin ella no tienen sentido los logros obtenidos.

A mi abuelita † porque fue una parte muy importante en mi vida y porque siempre vas conmigo, con infinito amor y agradecimiento.

A mi mamá: Por la educación, el apoyo incondicional, el amor que me has brindado y los valores inculcados en mí, no hay nada que no deba a ti.

A mis hermanos: Yessica, Paola, Gina, José Juan y especialmente a mi hermano y amigo Wily quien ha sido un ejemplo para mí, por todo su apoyo, cariño, consejos de aliento y preocupación. Ustedes han sido el mejor regalo que tengo gracias por su compañía.

A mis tíos: Edmundo y Carmen y mis primos: Gil y Mary por sus valiosos consejos y apoyo que me alientan a seguir adelante.

A Bety por su amor, apoyo, compañerismo y paciencia, y porque ha sido uno de los más importantes estímulos en mi vida... gracias cariño. Agradezco la confianza y cariño brindados por parte de su familia, principalmente de su mamá.

A mis compañeros y amigos de la FES Iztacala: Sofía Martha y Laura por su amistad y cariño, en especial a José Luis y Alfredo a quienes estimo como hermanos.

A mis amigos Gustavo, Israel, Juan, Isaac, Victorino, José, Oscar, Salome, Alberto, José Antonio, Luis, Aurelio, a mis compañeros del C.U.A. y muy en especial a Misael, Pedro y Miguel Angel, con todos ellos he convivido en diferentes tiempos pero siempre estarán en mi memoria.

Este trabajo fue en parte posible gracias a la ayuda de muchas personas. A todas ellas mi especial agradecimiento.

A mi tutor Dra. Rebeca G. Manning Cela

Por su apoyo y dirección de esta tesis, así como la oportunidad que me dio de ser su estudiante. Por su comprensión, afecto, invaluable paciencia y consejos personales brindados durante mi estancia... mi admiración, cariño y respeto.

A la Q.F.B. Claudia Márquez Dueñas

Por la ayuda técnica brindada durante mi formación en el laboratorio.

Al CINVESTAV en su Departamento de Biomedicina Molecular por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo experimental

Al laboratorio de la Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio

Por el apoyo en el préstamo de equipo de laboratorio así como la donación de amibas.

Al Técnico Alejandro Trejo Carmona.

Por su amistad, entusiasta colaboración y por transmitirme todos sus conocimientos en el manejo del cultivo de amibas

Al Técnico Pedro Carrasco Cerón.

Por su asesoría técnica así como su gran disposición para proveer de material el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Horacio, Alberto y muy en especial a mi colega Julio que es como un hermano, por sus comentarios y sugerencias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	IZT.	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS		2
3. LISTA DE FIGURAS		4
4. INTRODUCCIÓN		6
4.1. Generalidades y prevalencia		6
4.2. Manifestaciones clínicas		6
4.3. Ciclo de vida		6
4.4. Morfología		7
4.5. Infectividad		8
4.6. Tráfico vesicular		8
4.7. Proteínas fluorescentes		9
4.8. Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi.		10
5. ANTECEDENTES DIRECTOS		14
6. JUSTIFICACIÓN		15
7. OBJETIVOS		16
7.1. Objetivo general		16
7.2. Objetivos particulares		16
8. MATERIALES Y MÉTODOS		17
8.1. Material biológico		17
8.2. Diseño de oligonucleótidos		18
8.3. Amplificación por PCR		21
8.4. Purificación del producto PCR		23
8.5. Electroforesis verticales de ADN en geles de agarosa		23
8.6. Obtención de células calcio competentes		24
8.7. Transformación de las células calcio competentes		26
8.8. Extracción de ADN de plasmido		26
8.9. Digestión del ADN con enzimas de restricción		28
8.10. Purificación de ADN de geles de agarosa		31
8.11. Ligación		31
8.12. PCR de la colonia bacteriana		33
8.13. Cuantificación espectrofotométrica de ADN		34
8.14. Transfección de amibas con pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' con Fosfato de Calcio		35
9. DIAGRAMA EXPERIMENTAL		36
10. ESQUEMA EXPERIMENTAL 1		37

11. ESQUEMA EXPERIMENTAL 2	38
12. RESULTADOS	39
12.1. Construcción de los vectores de transfección pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3'	39
12.2. Construcción de los vectores de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'	45
12.3. Transfección de Trofozoitos de <i>Entamoeba histolytica</i> con pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'	52
13. DISCUSIÓN	54
14. CONCLUSIONES	58
15. APÉNDICE	59
16. REFERENCIAS	62

1

RESUMEN

La amibiasis es una enfermedad ocasionada por *Entamoeba histolytica*. Para que sobreviva este parásito requiere de una actividad fagocítica, pinocítica y exocítica muy intensa. Estos mecanismos ampliamente descritos en otros organismos requieren de una maquinaria de tráfico vesicular y la participación de varios organelos que hasta ahora no han sido descritos completamente en *E. histolytica*. Estudios recientes han mostrado que esta amiba presenta vesículas que pueden ser citoquímicamente caracterizadas como un Retículo Endoplasmico (RE) y un Aparato de Golgi (AG). El uso de anticuerpos dirigidos contra proteínas que radican en estas estructuras, así como el uso de moléculas marcadoras fusionadas a secuencias que las dirigen al RE, identificaron también una serie de vesículas secretoras de diversos tamaños que se sugiere correspondan a un probable RE y AG en amiba. Además, se han clonado genes que codifican para proteínas propias de estos organelos. A fin de obtener herramientas moleculares que faciliten el estudio de los mecanismos de tráfico vesicular en este parásito, los objetivos de este trabajo fueron la construcción de los vectores de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' y su uso para transfectar trofozoítos de *E. histolytica* capaces de expresar la proteína verde fluorescente (*EGFP*) y una quimera de ésta fusionada a una secuencia KDEL (*EGFP-KDEL*) que la dirija al RE. Estos vectores contienen la secuencia *EGFP* o *EGFP-KDEL* y la secuencia de *Neo* bajo la expresión del promotor y regiones de poliadenilación de actina de *E. histolytica*. Se obtuvieron los plásmidos de transfección pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' como se demostró tanto por su patrón de restricción como por la amplificación de la secuencia *EGFP* y *EGFP-KDEL* por PCR. Posteriormente se obtuvieron los plásmidos de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' demostrándose, por su patrón de restricción. En estas dos últimas construcciones se obtuvieron las dos posibles diferentes orientaciones lo cual fue demostrado por análisis de restricción. Finalmente se obtuvo una transfección transitoria exitosa en la que se logró la expresión de la proteína *EGFP* y *EGFP-KDEL* bajo la dirección del promotor y secuencias de poliadenilación del gen de actina de *Entamoeba histolytica*. La proteína *EGFP* se localizo en el citoplasma de la célula transfectada cuando se usó el plásmido pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3, después de 56 hrs. post-transfección. Cuando se fusionó la secuencia KDEL en el C-terminal de la proteína *EGFP* la fluorescencia se localizó en vesículas después de 56 hrs. post-transfección. Estos resultados sugieren que estas vesículas podrían corresponder a un posible RE en amiba. Este trabajo de investigación también muestra que el uso de proteínas fluorescentes podrían ser una herramienta útil para el estudio *in vivo* de los procesos de tráfico vesicular y localización de organelos celulares en amiba.

2

LISTA DE ABREVIATURAS

A5'	Región flanqueante 5' de actina de <i>E. histolytica</i>
A3'	Región flanqueante 3' de actina de <i>E. histolytica</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Aparato de Golgi
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
dATP	2'-Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-Desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-Desoxitimidina 5'-trifosfato
dCTP	2'-Desoxicitidina 5'-trifosfato
DEAE-dextran	Dietilaminoetildextran
D.O.	Densidad óptica
C-terminal	Carboxilo terminal
°C	Grados centígrados
EDTA	Etilenediaminetetraacetato
EGFP	Proteína verde fluorescente Aumentada
ELT	Enzima lizosima tritón
ERD2	Receptor de KDEL
gr	Gramos
G418	Gentamicina
GFP	Proteína verde fluorescente
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
Kb	Kilo bases
nm	Nanometro
kDa	Kilo daltones
KDEL	Secuencia tetrapeptídica para la retención de ciertas proteínas
LB	Luria Broth
M	Molar
MCS	Sitio múltiple de clonación
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Mili molar
ng	Nano gramos
nm	Nanómetros
N-terminal	Amino terminal
pb	Pares de base
pBS +/-	Plásmido blue scribe +/-
PBS	Buffer salino de fosfatos

PEG	Polietilen glicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Retículo Endoplásmico
EGIC	Compartimento intermedio RE-Golgi
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
seg.	Segundos
TAE	Buffer Tris-acetato
TE	Buffer Tris-Cl-EDTA
TBE	Buffer Tris-borato
TNG	Trans Golgi Net
TS	Buffer Tris-HCl-Sacarosa
Tm	Temperatura de alineamiento
U. V.	Ultravioleta
µm	Micrometros
µl	Microlitros
µM	Micromolar

3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
Figura 2. Mecanismo utilizado para retener las proteínas residentes en el RE	13
Figura 3. Diseño del oligonucleotido SMC-1 SENSE y SMC-1 <i>EGFP</i> - ANTISENSE	20
Figura 4. Diseño del oligonucleotido SMC-1 SENSE SMC-1 <i>EGFP</i> -KDEL- ANTISENSE	21
Figura 5. Marcadores Moleculares, GIBCO BRL	24
Figura 6. Amplificación de la secuencia que codifica para <i>EGFP</i> y <i>EGFP</i> - KDEL por PCR	39
Figura 7. Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'NeoA3' (<i>EcoR</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Nco</i> I, <i>BamH</i> I y <i>Xba</i> I)	40
Figura 8. Digestion de pA5'NeoA3' con <i>Kpn</i> I y <i>BamH</i> I	41
Figura 9. pA5'___A3' purificado	41
Figura 10. Análisis de PCR de colonia para pA5'EGFPA3'	42
Figura 11. Análisis de PCR de colonia para pA5'EGFP-KDELA3'	42
Figura 12. Análisis de restricción para pA5'EGFPA3' (clona 26)	44
Figura 13. Análisis de restricción para pA5'EGFP-KDELA3' (clona 13)	45
Figura 14. A) Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'EGFPA3'(clona 24) y B) pA5'EGFP-KDELA3' (clona 13), <i>EcoR</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Nco</i> I, <i>BamH</i> I y <i>Xba</i> I	43
Figura 15. Digestion de pA5'NeoA3', pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' con <i>EcoR</i> I y <i>Xba</i> I	46
Figura 16. Fragmentos A5'NeoA3', A5'EGFPA3' y A5'EGFP-KDELA3' Purificados	46
Figura 17. Análisis de restricción de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7)	48

Figura 18. Análisis de restricción de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7) 48

Figura 19. Determinación de la orientación del inserto de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7) 48

Figura 20. Determinación de la orientación del inserto de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7) 49

Figura 21. Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7) (Nco I, Xba I, Sph I y Pst I) 50

Figura 22. Análisis de fluorescencia de Trofozoítos de *E. histolytica* transfectados 53

4

INTRODUCCIÓN

4.1. Generalidades y prevalencia

La amibiasis es una enfermedad ocasionada por *Entamoeba histolytica*. Las dos especies amibianas que parasitan al hombre son *E. histolytica* y *E. dispar*, pero es solo la primera la que llega a producir enfermedades graves tales como colitis invasiva y abscesos hepáticos (Jackson y Ravdin, 1996). Se estima que aproximadamente 500 millones de personas en el mundo están infectadas con cualquiera de las especies de *Entamoeba* mencionadas. De los individuos infectados con *E. histolytica* aproximadamente 40 millones desarrollan lesiones primarias, las cuales pueden anteceder a abscesos extraintestinales que llegan a ocasionar hasta 100 mil muertes por año; ocupando así, el tercer lugar de enfermedades parasitarias mortales, ubicándose solo después de la malaria y la esquistosomiasis (Walsh, 1988). Se presenta mas comúnmente en países que carecen de un desarrollo socioeconómico adecuado, tales como: India, Egipto, Turquía y México. La forma más común de transmisión es por comida y agua contaminadas, los cuales contienen los quistes que es la fase infectiva de este parásito, o por transmisión directa por la ruta fecal-oral (Pérez-Tamayo, 1986).

4.2. Manifestaciones clínicas

La amibiasis puede presentarse en forma crónica, subaguda o aguda. La forma crónica se presenta en individuos cuyo intestino grueso ha sido colonizado por las amibas, pero que no presentan síntomas de la enfermedad (ameboma). La forma subaguda se presenta como disentería y diarrea. Y finalmente la forma aguda que se manifiesta con apendicitis y colitis amibiana, así como con el desarrollo del absceso hepático que causa un alto índice de mortalidad (Treviño y col., 1994).

4.3. Ciclo de vida

Como se muestra en la Figura 1 el ciclo de vida de *E. histolytica* inicia con la infección del parásito después de la ingestión de quistes maduros ❶ en alimentos, agua o manos contaminadas con heces. El desenquistamiento ❷ ocurre en el intestino delgado en donde los trofozoítos ❸ son liberados migrando al colon. Aquí, los trofozoítos se reproducen por fisión binaria transformándose en quistes ❹ los cuales son eliminados con las heces fecales. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo siendo así los responsables de la transmisión de la enfermedad, contrario a los trofozoítos que en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A: infección no invasiva) de los individuos infectados comportándose como portadores asintomático eliminando quistes continuamente. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal) o a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones, cerebro, etc. (C: enfermedad extraintestinal). Se ha establecido también, que las formas invasivas (*E. histolytica*) y no invasivas (*E. dispar*) representan especies distintas siendo morfológicamente indistinguibles (CDC, Atlanta, 1999).

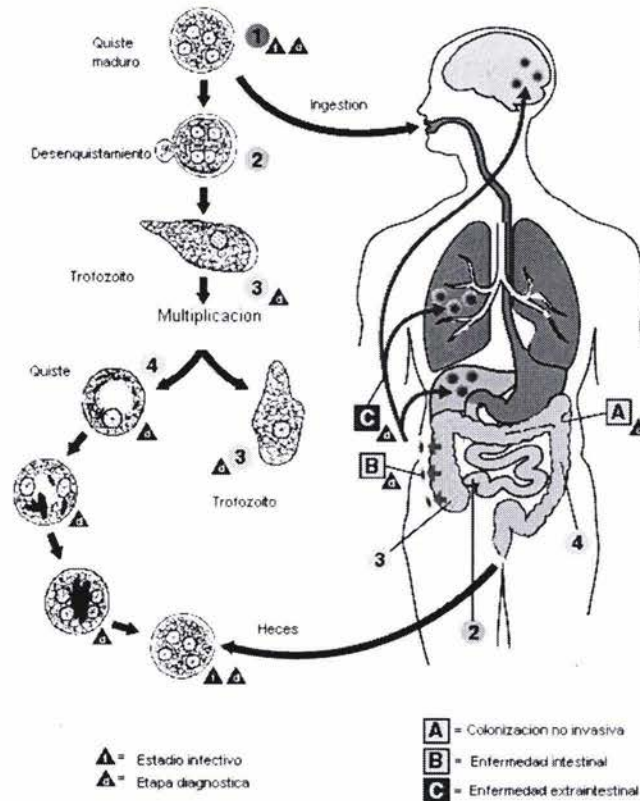


Figura 1. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*
(Tomado de CDC, Atlanta, 1999).

4.4. Morfología

E. histolytica presenta una fase infecciosa llamada quiste y una forma invasiva, el trofozoito. El quiste tiene un diámetro promedio de 12 μm , contiene de 1-4 núcleos dependiendo de su madurez. La pared celular del quiste es impermeable y esta compuesta de quitina (un polímero N-acetil-D-glucosamina) que la hace resistente a los ácidos estomacales. Por otro lado el diámetro promedio del trofozoito es de 25 μm , contiene de uno a varios núcleos con cromatina fina en la periferia y un nucleolo central; un citoesqueleto primitivo, constituido principalmente por filamentos de actina, su citoplasma contiene abundantes vacuolas fagocíticas, macropinocíticas, micropinocíticas, tempranas y tardías endosomas y lisosomas extremadamente variables en tamaño mostrando diámetros de 0.5 hasta 9.0 μm . Se mueven por la formación de pseudópodos sin microfilamentos aparentes, también forman filopodios los cuales son proyecciones fagocíticas con vacuolas orientadas al exterior, y un uroide que induce una redistribución de los componentes superficiales los cuales son dejados en el medio sugiriéndose que esta cápsula es un mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Ravdin, 1995; Martínez-Palomo, 1989; Bakker-Grunwald y Wostman, 1993). Los trofozoitos pueden vivir y multiplicarse indefinidamente como comensales en el tracto intestinal, sin embargo, por causas desconocidas en algunos casos la amiba puede invadir la mucosa y el tejido del epitelio

intestinal, lo que le permitirá invadir diferentes órganos en el huésped infectado siendo preferentemente el órgano blanco el hígado.

4.5. Infectividad

Durante la invasión, *E. histolytica* primero penetra en la mucosa del parénquima intestinal y luego interactúa con células subepiteliales, a las cuales mata y fagocita (Meza, 2000), por lo que los mecanismos involucrados en la invasión a tejido por *E. histolytica* son: Adhesión a las células intestinales, citólisis dependiente del contacto amiba-célula, liberación de proteasas, fagocitosis y la movilidad de la célula amibiana (Bailey y col., 1985).

Este parásito tiene un alto grado de actividad endocítica que lo hace capaz de internalizar una gran cantidad de materiales particulados y celulares de su hospedero (Verdugo y col., 1997). Durante el proceso de adhesión a la célula blanco se ha mostrado también que *E. histolytica* ataca bacterias, células epiteliales y eritrocitos; vía lectinas las cuales reconocen azúcares Gal o GalNac sobre la superficie de células blanco (Mann y col., 1991; McCoy y col., 1993). La amiba mata a la bacteria o lisa a la célula huésped dentro de sus fagolisosomas por una vía oxígeno-independiente, incluyendo lisosomas, cisteína proteasas y ameboporos (también conocidos como péptidos formadores de poros) (Bruchhaus y col., 1996; Leippe, 1997; Scholze y Tannich, 1994). También han sido identificadas proteínas lisosomales en el sobrenadante de trofozoítos cultivados: ácido fosfatasa, colagenasas, glicosidasas, esterasas y cisteína proteasas pero no péptidos formadores de poros (Aragual y col., 1989; Leippe y col., 1995; Talamas-Rohana y Meza, 1988).

4.6. Tráfico vesicular

E. histolytica ha sido considerada una célula primitiva debido a que ésta carece de organelos que son encontrados usualmente en células eucarióticas, tales como mitocondrias, peroxisomas, o un Aparato de Gogi y retículo endoplasmico bien estructurado (Meza, 1992; Barkker-Grunwald y Wostmann, 1993; Hasegawa y col., 1993). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que *E. histolytica* presenta una membrana característica que puede ser citoquímicamente caracterizada como un retículo endoplasmico y un complejo de Golgi (Mazzuco y col., 1997; Gosh y col., 1999). Por otra parte Sánchez-López y col., en 1998 clonaron un gen en amiba que codifica para una señal de retención de proteínas residentes en el lumen del retículo endoplasmico denominado receptor ERD2 el cual es una proteína transmembranal del *cis*-Golgi. Recientemente Tovar y col. y Mai y col. en 1999 mostraron que *E. histolytica* presenta genes que codifican para una proteína de choque térmico de 60-kDa (Hsp60, una chaperonina mitocondrial) similar a la encontrada en otros eucariotes en los que se encuentra en un organelo citoplasmático denominado el mitosoma o *crypton*. Estas evidencias sugieren que *E. histolytica* contiene organelos equivalentes a los encontrados en otros eucariontes para realizar las funciones de transporte vesicular, considerándose ahora que no es tan primitivo en relación a otros eucariontes como inicialmente se consideraba (Clark, 1999).

Estos antecedentes nos muestran que para que este parásito sobreviva requiere de una actividad fagocítica y pinocítica así como exocítica muy intensa. Estos mecanismos ampliamente descritos en otros organismos requieren de una maquinaria de tráfico vesicular y la participación de varios organelos que hasta ahora no han sido descritos completamente en *Entamoeba histolytica*.

4.7. Proteínas fluorescentes

En varios sistemas, el uso de proteínas fluorescentes ha sido de gran utilidad para estudiar el tráfico vesicular así como la localización de proteínas en diversos organelos celulares permitiendo así, la descripción morfológica de varios de estos. Estas metodologías han permitido un adelanto importante en este campo dando también la enorme ventaja de realizar estudios *in vivo*.

La proteína verde fluorescente (*GFP*) descubierta por Shimomura en 1964, es una proteína que se encuentra en forma natural en celenterados, tales como la medusa del Pacífico, *Aequoria victoria* (Morin, y Hastings, 1971). Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con Ca^{++} llamada aequorina, la cual emite una luz azul-verde y una proteína verde fluorescente accesoria que capta la energía de la aequorina y la re-emite como una luz verde (Morise y col., 1974). La proteína verde fluorescente es muy estable y esta compuesta de un monómero de 27-kDa de 238 aminoácidos. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado covalentemente que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente), la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación a un *p*-hidroxibenciliden-imidazolina. Esta modificación postraducciona ocurre de 2 a 4 horas después de la síntesis y posiblemente sea auto catalítica (Prasher y col., 1992; Heim y col., 1994). El espectro de excitación de la *GFP* nativa de *A. victoria* (azul) tiene dos picos a 375 nm y uno mas pequeño a 470 nm. Mientras que el espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico de 509 nm (Cubitt y col., 1995). Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de molécula lo que le proporciona las siguientes características: 1) Es muy resistente a la desnaturalización bajo tratamientos con guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y hasta dos días de tratamiento con varias proteasas tales como; tripsina, quimiotripsina y papaina a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Es estable en amortiguadores neutros hasta 65°C y muestra un amplio rango de estabilidad ante pH de 5.5 a 12. 2) Deleciones de más de la Met de su N-terminal o más de siete aminoácidos del C-terminal resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del fluoroforo estén intactas. Probablemente porque la estructura beta-can no puede ser formada aun cuando solo una pequeña parte del "can" esta ausente. 3) La presumible encapsulación rígida del cromóforo es probablemente el responsable para el pequeño cambio de Stokes, el alto rendimiento de fluorescencia y la inhabilidad del oxígeno de amortiguar el estado de excitación. 4) La *GFP* puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su N-terminal o C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la *GFP* parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can, por lo que la estructura de la *GFP* no se distorsiona significativamente por la fusión de la proteína continuando con su capacidad fluorescente (Dopf y Horiagan, 1996; Ward y Bokman, 1982; Chalfie y col., 1994; Ormo y col., 1996).

Como se mencionó anteriormente una de las aplicaciones más exitosas de las proteínas fluorescentes, es el poder fusionarlas a proteínas de interés monitoreando así la localización y características de esta última. En este caso el gen que codifica para la *GFP* es fusionado con el gen que codifica para la proteína de interés y la quimera resultante se expresa en la célula blanco manteniendo las funciones normales y la localización de la proteína a estudiar, observándose una ligera señal desde las primeras 5 hrs post-transfección. Ya que el tamaño y la forma de la *GFP* y los diferentes pHs así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares no parecen ser una barrera importante en la expresión de esta proteína, se han obtenido resultados exitosos al expresar y localizar quimeras con la *GFP* en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplasmico, Aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas, citoesqueleto y la membrana plasmática, etc. permitiendo así un análisis *in vivo*. Por otra parte la enorme flexibilidad que tiene como marcador no invasivo en células vivas sirve para otras numerosas aplicaciones tales como: Trazar líneas celulares, como reportero de la expresión de genes, como etiqueta para localizar proteínas en células vivas y como una medida en el estudio de interacciones proteína-proteína (Tsien, 1998; Mitra y col., 1996).

Los factores más importantes que afectan o de los cuales depende la detectabilidad de la *GFP* son los siguientes: cantidad total de la *GFP* (numero de copias del gen y duración y grado de la expresión), eficiencia de la formación del fluoróforo después de la traducción (disponibilidad de los chaperones, tiempo, temperatura, disponibilidad de O₂ y la velocidad intrínseca de ciclización/oxidación), propiedades moleculares de la *GFP* madura (dimerización), competencia con otras señales de fondo (autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión), etc. (Tsien, 1998).

Análisis mutacional del fluoróforo y de otras regiones de la *GFP* silvestre ha sido modificada de varias maneras produciendo iso-formas que permiten tanto para la optimización de la fluorescencia así como para una mayor expresión u estabilidad en diferentes sistemas eucarióticos. Existen diferentes variantes dentro de las cuales está la *EGFP* (proteína verde fluorescente aumentada de la palabra en ingles “enhanced”). Esta mutante ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima =488 nm; emisión máxima = 507). El plasmido pEGFP codifica la variante *GFPmut1* que contiene una substitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr, además la secuencia que codifica a la *EGFP* contiene más de 190 cambios de base silenciosos que corresponden al uso de codones de humano. La secuencia flanqueante cuesta arriba ha sido convertida al sitio de inicio de la traducción de Kozak para aumentar la eficiencia de traducción en células eucarióticas. El cromóforo de la *EGFP* tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la *GFP* (Clontech, pagina web).

4.8. Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi

Como se mencionó anteriormente *E. histolytica* requiere de un trafico vesicular muy intenso el cual juega un papel importante en su patogenicidad; sin embargo, poco se conoce acerca de la participación de los organelos que regulan este transporte intracelular en el parásito.

En las células eucariotas, el tráfico proteico a través de la ruta secretoria ocurre por transporte vesicular entre compartimentos membranosos los cuales difieren en su organización, estructura y función. Las características únicas de los organelos son mantenidas a pesar del continuo transporte de membrana entre ellos y los componentes solubles. Muchos esfuerzos han sido dirigidos para entender como opera este complejo celular (Rothman, 1994).

El mantenimiento de la organización funcional y estructural de una célula eucariótica requiere de la correcta distribución de proteínas y lípidos a sus destinos. Esto es llevado a cabo por la entrega o el regreso de nuevo material sintetizado a través de la ruta secretoria. Varios modelos han sido sugeridos al paso de los años para explicar como fluye el tráfico dentro de la ruta secretoria. Las evidencias experimentales obtenidas hasta la fecha apoyan fuertemente el modelo vesicular como el modo general de transporte intracelular.

Una vez que una proteína es sintetizada en los ribosomas puede permanecer en la parte soluble del citoplasma (citósol), ser dirigida a mitocondrias o el núcleo, enviada a la membrana plasmática o celular, o a organelos internos como lisosomas. Este proceso de clasificación y reparto fue demostrado por Sabatini y Blobel en 1970 el cual consiste en una señal que denominaron péptido señal en la zona amino terminal (la primera en ser sintetizada) de ciertas proteínas dirigiéndolas así al Retículo Endoplásmico (RE). El (RE) es la estructura membranosa más grande dentro de la célula que esta compuesta de tres subcompartimentos morfológicamente distintos: el que esta rodeando al núcleo, el RE rugoso y el RE liso. Recientemente ha sido sugerido que el RE puede ser dividido dentro de subdominios especializados que son distintos en términos de sus proteínas constituyentes, apariencia morfológica y funciones. Las proteínas residentes en el RE se clasifican en cinco grupos: proteínas implicadas en la translocación y el transporte vesicular, enzimas implicadas en el plegamiento de proteínas, enzimas implicadas en modificaciones post-traduccionales, en biosíntesis de lípidos y en el mantenimiento y almacenamiento de Ca^{2+} . (Montero y col., 1997). En él se produce una interacción entre el péptido señal de la proteína naciente (el cual varía entre 13 y 36 aminoácidos) y receptores específicos que provocan la translocación al interior del RE de la nueva proteína en un proceso dependiente de energía de hidrólisis del ATP; posteriormente, la secuencia señal es eliminada por una peptidasa (Sudhoff, 1995). Otras modificaciones tienen lugar en este compartimento, se forman por ejemplo puentes disulfuro de las proteínas (entre aminoácidos cisteína) que contribuyen a que las proteínas se plieguen adquiriendo una conformación funcional, y muchas otras proteínas son glucosiladas. La glucosilación consiste en la adición de oligosacaridos unidos a asparagina por puentes N-glucosídicos (N-glucosilación) o a serina y treonina por puentes O-glucosídicos (O-glucosidación) en secuencias de aminoácidos concretas.

El transporte de proteínas del RE al Aparato de Golgi (AG) involucra el compartimento intermedio RE-Golgi (REGIC). Aunque la naturaleza del REGIC es discutida, por lo general se acepta que este juega un papel similar a una estación de distribución y recuperación de membrana (Scales y col., 1997).

Posteriormente las proteínas son dirigidas al AG el cual consiste en un conglomerado de sacos membranosos que tiene dos funciones principales: la modificación y elaboración de unidades de carbohidratos y la clasificación de las moléculas para el siguiente destino que serán los lisosomas, la membrana plasmática o gránulos de secreción. El AG a su vez se diferencia en tres compartimentos: *Cis*-Golgi (proximal al RE), Golgi Medio y *Trans*-Golgi donde realmente se produce la exportación de las proteínas dentro de diferentes tipos de vesículas de transporte destinadas a endosomas, lisosomas, gránulos secretorios, y la membrana plasmática (Rothman, 1994).

Una vez que la proteína está propiamente “madura”, esta pasa el control de calidad del RE y sale de este compartimento por medio de vesículas de transporte. El transporte de las proteínas desde el RE al *Cis*-Golgi tiene lugar mediante la formación de vesículas acarreadoras. Existen dos tipos de vesículas: a) cubiertas con clatrina, que median el transporte de la superficie celular a través de la vía endocítica, así como también la exportación de proteínas de la red *Trans*-Golgi a compartimentos vacuolares o lisosomales y b) las no cubiertas con clatrina, COPI y COPII, son responsables del tráfico entre compartimentos de la vía secretoria temprana: transporte del RE al ERGIC que utiliza vesículas cubiertas COPII, el transporte del ERGIC al *Cis*-Golgi y a través del AG es mediado por vesículas cubiertas COPI. Las vesículas COPI están también involucradas en el tráfico de vesículas que regresan del AG al RE. Posiblemente actúen en el tráfico del TNG (Trans Golgi Net) a la superficie celular (Olikkonen y Stenmark, 1997).

Los carbohidratos añadidos en el RE son modificados en cada uno de los compartimentos del AG en un proceso denominado glucosilación terminal frente al proceso de glucosilación central que tiene lugar en el RE. Este proceso de glucosilación terminal contendría la O-glucosilación y modificaciones de N-glucosilación. Se asume que el RE es una estación de control de calidad que impide que las proteínas incorrectamente plegadas (y por tanto, no funcionales), progresen a través de la vía secretora o bien son unidas a la proteína de unión especial BiP o bien forman agregados que no pueden ser empaquetados y finalmente son degradadas en el propio RE. La retención de ciertas proteínas solubles, residentes en el RE está mediada por una corta secuencia peptídica presente en el extremo carboxílico de estas proteínas la cual es necesaria y suficiente para retener las proteínas residentes en el RE. Esta secuencia está formada por los aminoácidos Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL según la simbología de una letra utilizada para designar aminoácidos). Posteriormente se han descrito otras secuencias que también son señales de retención en el RE como, señales Lys-Lys-X-X y señales X-X-Arg-Arg (donde X puede ser cualquier aminoácido) (Pelham, 1989). Si por ejemplo mediante ingeniería genética se elimina esta señal de retención en el ER de la proteína BiP, se observa cómo esta proteína es secretada al exterior de la célula; y si la señal se transfiere a una proteína que normalmente es secretada, ahora queda retenida en el RE. Esta señal no consiste en un anclaje de las proteínas residentes del lumen del RE sino en una recuperación selectiva después de que hayan sido transportadas en vesículas y descargadas en la red del *cis*-Golgi. En la red *cis*-Golgi un receptor de membrana específico une a todas las proteínas que presentan la señal de retención en RE y las empaqueta en vesículas de transporte especiales que las devuelve al RE. Así pues, para estas proteínas residentes el RE es como una prisión abierta: no hay nada que impida que salgan, pero si lo hacen, son transportadas de nuevo al interior del RE (Alberts y col., 1996).

En la actualidad se cree que existen dos mecanismos (Figura No. 2) distintos para asegurar el mantenimiento de proteínas en el RE: la retención por exclusión activa y el retrotransporte desde el AG al RE. Esta segunda posibilidad ha sido demostrada tanto para el motivo KDEL como para el motivo di-lisina (Lys-Lys-X-X). También se ha visto que otras proteínas jamás abandonan el orgánulo, y se supone que estas proteínas no se llegan a incorporar a las vesículas que se generan en el RE (Teasdale y Jackson, 1996).

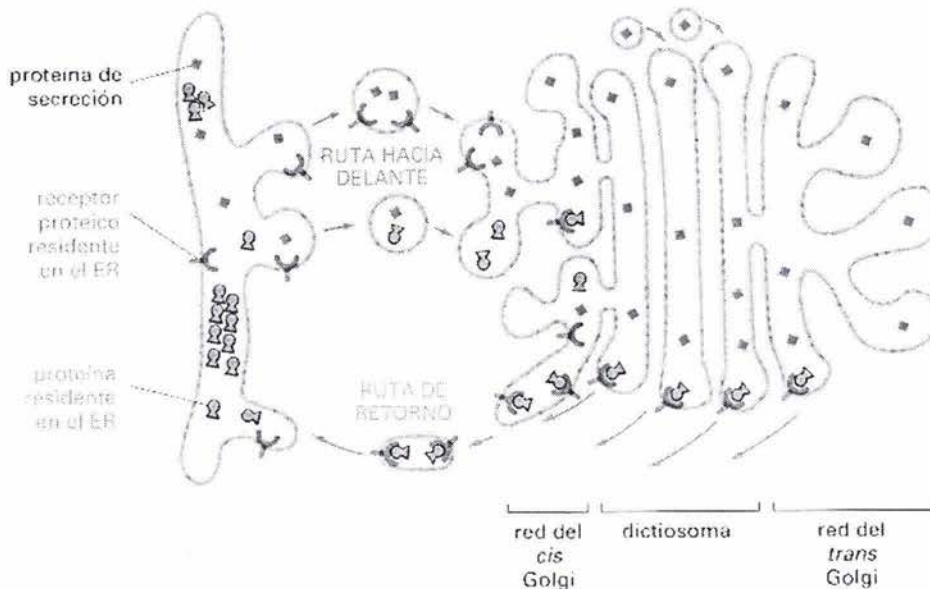


Figura 2. Mecanismo utilizado para retener las proteínas residentes en el RE

Las proteínas residentes en el RE que se escapan hacia la red del *cis*-Golgi son devueltas al RE mediante transporte vesicular. Un receptor de membrana en la red *cis*-Golgi captura las proteínas y las conduce en vesículas de transporte, hacia el RE. Las condiciones iónicas presentes en el RE separan las proteínas de su receptor, de forma que el receptor regresa a la red *cis*-Golgi para ser reutilizado. Se han encontrado también receptores que reconocen la señal de retención en el RE en las cisternas *cis*, *medial* y *trans* del Golgi. De esta manera, la recuperación de las proteínas del RE empieza en la red del *cis*-Golgi, pero la ruta de retorno también funciona en las cisternas más *trans* del Golgi. En el lumen del RE se producen interacciones entre las proteínas residentes en el RE, que ayudan a su retención. Estas interacciones retardan la salida de las proteínas del RE en relación con las proteínas que han de ser secretadas (proteínas de secreción). En experimentos en los que se ha eliminado la señal de retención de RE de la proteína BiP, se observa cómo la BiP abandona el RE y es secretada por la células; ahora bien, su salida del RE tiene lugar más lentamente que las proteínas de secreción *bona fide*, lo cual indica que BiP es parcialmente retenida en el RE mediante interacciones débiles con otras proteínas (Tomado de Alberts y col., 1996).

La identificación de marcadores moleculares característicos de compartimentos involucrados en el tráfico proteico es un planteamiento muy atractivo que evidenciaría la presencia de RE y AG siendo buenos candidatos para este estudio el gen ERD2 o receptor de KDEL, así como moléculas conteniendo la secuencia KDEL.

5 ANTECEDENTES DIRECTOS

Una característica importante de *E. histolytica* es su alta actividad endocítica y exocítica, incluyendo la velocidad de fagocitosis y la secreción de varias proteínas amibianas; todas estas, funciones relacionadas a la patogenicidad del parásito (Orozco y col., 1983; Rodríguez y Orozco, 1986; Muñoz y col., 1991; McKerrow y col., 1993; Agragual y col., 1989). Aunque la activación secretoria esta bien definida y es aparentemente necesaria para propiedades líticas e invasivas de la célula, organelos típicos involucrados en la ruta secretoria de células eucariotas, tales como el retículo endoplasmico (RE) y complejo de Golgi no son fácilmente distinguibles.

Estudios iniciales de la ultraestructura de *E. histolytica* revelaron la ausencia de retículo endoplásmico y complejo de Golgi entre otros organelos, planteándose así la cuestión sobre, cuales son los mecanismos celulares y moleculares del trafico proteico en estos organismos. (Rosenbaum y Wittner, 1970; Serrano y col., 1977). Posteriormente Mazzuco y col., (1997) identificaron por microscopia confocal con NBD-ceramide y por microscopia electrónica de barrido con tiamina pirofosfatasa un posible aparato Golgi.

Estudios recientes utilizando marcadores de RE y AG revelaron la presencia de un gran numero de vesículas citoplasmáticas de diferentes tamaños y formas que se ha sugerido podrían realizar funciones equivalentes a retículo endoplásmico y complejo de Golgi (Ghosh y col., 1999).

Lo anterior se apoya con el hallazgo de marcadores con actividades propias del retículo endoplásmico tales como la dicol manosa fosfato sintetasa y regiones de ensamblaje de aspargina-oligosacarido que son comunes constituyentes de secreción y proteínas de membrana en células eucariotes (Villagómez-Castro y col., 1998; Vargas-Rodríguez y col., 1998).

La identificación de marcadores moleculares en *E. histolytica* característicos de compartimentos involucrados en el tráfico proteico como, el gen ERD2, determinan la capacidad y la especificidad de señal de la ruta de reciclaje del complejo de Golgi al RE que tienen estos parásitos (Sánchez-López y col., 1998).

También, se han descrito otros genes que codifican para ARF, SRP54, y proteínas Rab (EhRab7, EhRab11, EhRab5, EhRabB y EhRab8) los cuales están involucrados en el transporte intracelular en eucariotes superiores, sugiriendo que los trofozoítos de *E. histolytica* tienen una maquinaria de transporte similar al de eucariotes superiores pero presentan un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi estructuralmente primitivos (Ghosh y col., 1999; Ramos y col., 1997; Tanaka y col., 1997; Temesvari y col., 1999; Saiko-Nakano y col., 2000; Juárez y col., 2001)

6

JUSTIFICACIÓN

Lo anterior sugiere fuertemente la presencia de organelos similares a un Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi en *E. histolytica*, que pudieran participar en los eventos de endocitosis y exocitosis relacionados a la patogenicidad de la amiba, los cuales involucrarían un tráfico vesicular del que poco se conoce. Un enfoque para estudiar estos mecanismos, sería el uso de herramientas moleculares que permitan un estudio más profundo de su estructura y función para identificar y caracterizar estos organelos. El uso de proteínas fluorescentes ha abierto la posibilidad de monitorear *in vivo* la expresión y tráfico de moléculas. Por ello en este trabajo planteamos la construcción de vectores de transfección que dirijan la expresión de la proteína verde fluorescente (*EGFP*) y de una quimera con la fusión de esta proteína a una secuencia KDEL carboxilo terminal, con los que se podrá estudiar la estructura y organización del retículo endoplásmico en *E. histolytica*.

En base a estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos.

7

OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Expresión de la proteína verde fluorescente y la proteína verde fluorescente fusionada a la secuencia carboxilo terminal que codifica para una secuencia de retención KDEL de proteínas para retículo endoplasmico (*EGFP-KDEL*) en *Entamoeba histolytica*.

7.2. Objetivos particulares

- 1) Construcción de los dos vectores de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' bajo el promotor de actina de *Entamoeba histolytica*.
- 2) Clonar la proteína verde fluorescente (*EGFP*) así como una quimera conteniendo una secuencia carboxilo terminal que dirige la *EGFP* al retículo endoplásmico (*EGFP-KDEL*) en el vector de expresión pA5'NeoA3' reemplazando la secuencia de *Neo* por *EGFP* o *EGFP-KDEL*.
- 3) Obtención y clonación de los fragmentos *A5'EGFPA3'* y *A5'EGFP-KDELA3'* al fragmento *A5'NeoA3'* en el vector pBS(+/-) para obtener los vectores de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'.
- 4) Transfectar los vectores pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' en *Entamoeba histolytica* y analizar su expresión y localización bajo el microscopio de fluorescencia.

8

MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

1) Bacterias

- *Escherichia coli* DH10B: Son células para la construcción de bibliotecas geonómicas y clonación de ADN metilado y cADN. La cepa DH10B tiene una mutación *endA1*, la cual incrementa la calidad de ADN de plásmido de los minipreps y *hsdRMS* que permite la clonación del ADN sin cortes por endonucleasas de restricción endógenas. Esta acepta plásmidos de gran tamaño debido a una mutación *deoR* (Catalogo de Life Technologies, 2001).

Genotipo: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacZ* Δ M15 *lacX74deoR recA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK λ rpsL nupG*.

- *Escherichia coli* SURE: Estas células tienen una combinación de las mutaciones *recB* y *recJ* que les confiere un fenotipo deficiente de recombinación que reduce en buena medida la recombinación homóloga. Incrementan la estabilidad de ADN en secuencias repetidas invertidas o Z-ADN Reduce eventos de delección y re-arreglo. Produce minipreps de alta calidad (Catalogo de Stratagene, 2002).

Genotipo: *e14-(McrA-)* Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supe44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* (Kan^r) *uvrC* [F' *proAB lacI^qZ* Δ (M15Tn10(Tet^r)]

2) Parásitos

- Se usó la cepa de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. Esta cepa se creció en condiciones axénicas en medio TY-I-S-33 (Diamond y col., 1978).

3) Plásmidos

- pEGFP (3400 pb): *EGFP* es una mutante de la *GFP* silvestre la cual ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507). El plásmido pEGFP (proteína verde fluorescente aumentada de la palabra en inglés “enhanced”) codifica la variante GFPmut1 que contiene una substitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr, además la secuencia que codifica a la *EGFP* (720 pb) contiene mas de 190 cambios de base silenciosos que corresponden al uso de codones de humano. La secuencia flanqueante cuesta arriba ha sido convertida al sitio de inicio de la traducción de Kozak para aumentar la eficiencia de traducción en células eucarióticas.

El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP (Clontech, pagina web).

- pA5'NeoA3' (5076 pb): Consiste de fragmentos flanqueantes 5' y 3' de la secuencia que codifica para una región de actina A5' y A3' respectivamente, estas regiones fueron derivadas de una clona de 10-Kb de una biblioteca genómica de *E. histolytica*. El fragmento A5' contiene cerca de 480 pb de la flanqueante 5' a partir del nucleótido -6 con respecto al sitio de inicio de la traducción ATG. El fragmento A3' contiene cerca de 600 pb de la secuencia flanqueante actina 3' iniciando 6 pb corriente abajo del codón de paro de actina. Por otra parte contiene el gen de Neo^r (792 pb) que se clono entre las secuencias de A5' y A3' en los sitios *Kpn* I y *Bam*H I, esta secuencia le confiere resistencia a G418. Las secuencias antes mencionadas (A5'NeoA3') se clonaron en el vector pBS +/- (3204 pb) en los sitios *Eco*R I y *Xba* I (Hamann L y col. 1995; Nickel R y Tannich E. 1994).
- pBS +/- (3204 pb): Contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina, por lo tanto este antibiótico puede ser usado para seleccionar células que contienen el plásmido. También tiene un sitio de policlonación dentro del cual esta situado el gen *lacZ*, responsable de la producción de la enzima beta-galactosidasa. De esta manera, bacterias con pBS +/- sin ADN insertado dan como resultado colonias de color azul cuando crecen sobre medio más X-gal, un substrato colorimétrico. Sin embargo, si un segmento de ADN ha sido insertado en el sitio de policlonación dentro del gen *lacZ*, da como resultado una mutación la cual provoca que no se produzca la beta-galactosidasa y la colonia de bacterias con el plásmido es de color normal (blanco) (Stratagene pagina web).

8.2. Diseño de oligonucleótidos (Sambrook y col., 1989).

Para la elección de los *primers*, existen una serie de normas que nos pueden ayudar, aunque hay que indicar también que existen programas de ordenador que nos facilitan esta tarea (ADNsis, Primer3, etc.).

- El contenido de G + C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
- Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementaridad entre la pareja de *primers*, secuencias del primer y con otras regiones no deseadas de la secuencia usada como templado. Si ésta existe entre los extremos 3', se aumenta la posibilidad de que se creen dímeros de cebadores.
- Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.

- La T_m de hibridación de los cebadores ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45 y 65°C.

Para la amplificación por PCR del gen de la proteína verde fluorescente (*EGFP*) se utilizó como templado el plásmido pEGFP que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (*GFP*) la cual ha sido mutada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507) denominada *EGFP*.

Los productos de PCR se clonaron en un vector de expresión que tiene como característica el expresar el fragmento clonado bajo el promotor de actina de *E. histolytica* en la región flanqueante 5' y la secuencia para la poliadenilación del gen de actina de *E. histolytica* en la región flanqueante 3'.

- 1) Para la amplificación del fragmento de *EGFP* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

a) Oligonucleótido sentido 1 SMC-1 SENSE.

5' GCG GTA CCA **TGG** TGA GCA AGG GCG AGG AG 3'

-En negrillas se muestra la secuencia de la *EGFP* a partir del sitio de inicio de la traducción (indicado en negrillas y mayor tamaño).

-En subrayado se indica el sitio de restricción *Kpn* I.

-G+C 19/29 > 50% ∴ 60°.

b) Oligonucleótido antisentido 2 SMC-1 *EGFP*-ANTISENSE.

5' GGG GAT CCT **TAC** TTG TAC AGC TCG TCC ATG 3'

-En negrillas se muestra la secuencia complementaria de *EGFP* a partir del codón de paro (indicado en negrillas y mayor tamaño).

-En subrayado se indica el sitio de restricción *Bam*H I.

-G+C 16/30 > 50% ∴ 60°C

En donde el *primer* 1 representa el inicio (SMC-1 SENSE) y el *primer* 2 el final (SMC-1 *EGFP*-ANTISENSE) de la secuencia que codifica para *EGFP*.

El acoplamiento de los *primers* será el siguiente:

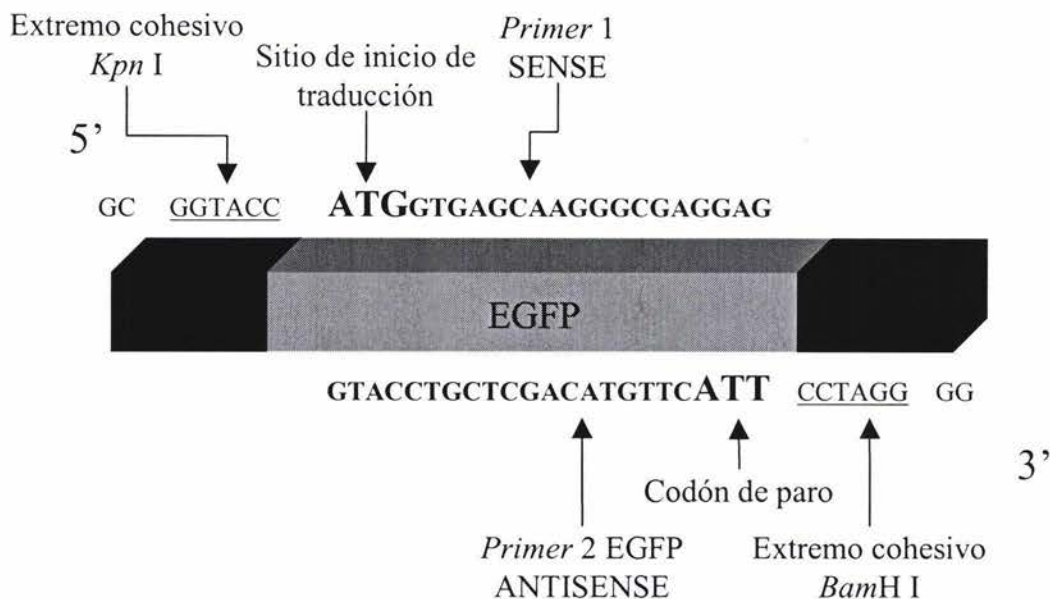


Figura 3. Diseño del oligonucleótido SMC-1 SENSE y SMC-1 EGFP-ANTISENSE

2) Para la amplificación del fragmento de *EGFP*-KDEL se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

a) Oligonucleótido sentido "1" SMC-1 SENSE.

5' GCG GTA CCA **TGG** TGA GCA AGG GCG AGG AG 3'

-En negrillas se muestra la secuencia de la *EGFP* a partir del sitio de inicio de la traducción (indicado en negrillas y mayor tamaño).

-En subrayado se indica el sitio de restricción *Kpn* I.

- G+C 19/29 > 50% ∴ 60°

b) Oligonucleótido antisentido "3" SMC-1 *EGFP*-KDEL-ANTISENSE

5' GGG GAT CCT *TAA* AGT TCA TCT TTC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CCG 3'

-En negrillas se muestra la secuencia complementaria de *EGFP* sin el codón de paro.

-En *italicas* se muestra la secuencia que codifica para KDEL incluyendo el codón de paro (indicado en mayor tamaño).

-En subrayado se indica el sitio de restricción *BamH I*.

-G+C 22/23 > 50% ∴ 60°C

El acoplamiento de los *primers* será el siguiente:

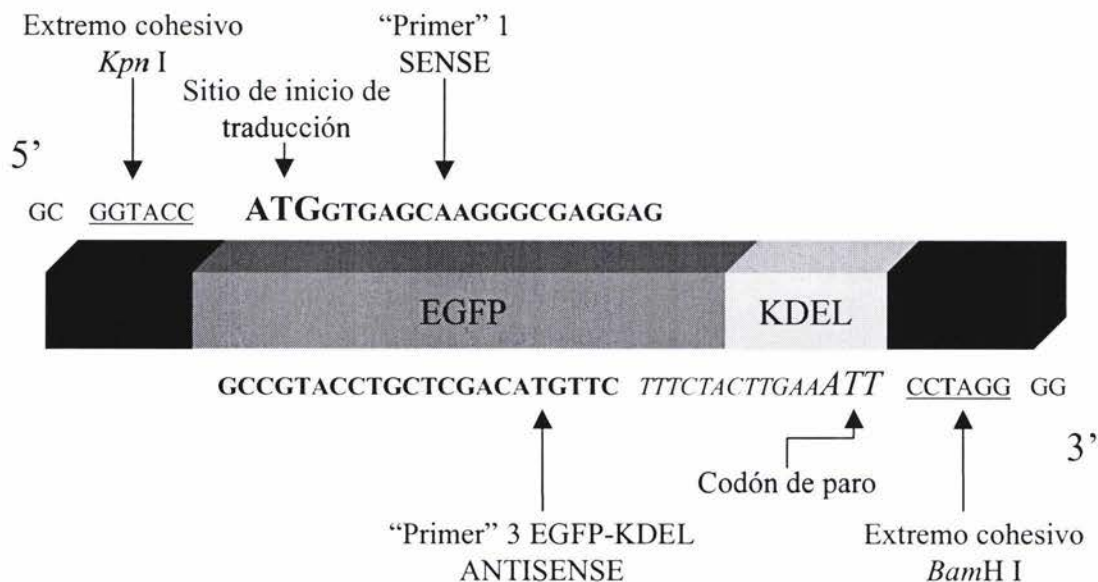


Figura 4. Diseño del oligonucleótido SMC-1 SENSE y SMC-1 EGFP-KDEL-ANTISENSE

En donde el *primer* 1 representa el inicio (SMC-1 SENSE) y el *primer* 3 el final (SMC-1 EGFP-KDEL ANTISENSE) de la secuencia que codifica para EGFP fusionado a la secuencia señal de retención de Retículo Endoplásmico (KDEL) y el codón de paro.

Para cumplir con esta meta se consideraron los siguientes criterios:

1. En cada primer se incluyó una secuencia para una enzima de restricción dando como resultado un extremo cohesivo lo que facilita su clonación en el vector (pA5' ___A3') y que permite la entrada en la fase de nuestra secuencia.

2. Se tuvo el cuidado de seleccionar el número y tipo de bases para obtener una T_m igual en ambos "primers" facilitando así las condiciones en los ciclos de amplificación.

8.3. Amplificación de EGFP y EGFP-KDEL por PCR (Sambrook y col., 1989).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica para la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN. El inventor de esta técnica fue Mullis quien se basó en la replicación del ADN de los organismos eucariotas

realizada por la ADN polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' al 3' usando un molde de cadena sencilla a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados cebadores los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN que se desee amplificar.

Partiendo de este principio, el PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1. Desnaturalización: La doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C).
2. Hibridación: Los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza cuando la temperatura baja (50-65°C).
3. Extensión: Se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena complementaria) en la dirección 5' a 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde, la etapa de extensión se realiza a 72°C.

Los componentes para realizar un PCR son los siguientes: muestra de ADN, cebadores, Taq ADN polimerasa, (una enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que soporta altas temperaturas), deoxinucleótidos trifosfato o dNTPs, (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), tampón de la reacción y sales.

El PCR es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia tener los siguientes cuidados para evitar contaminantes que puedan resultar en resultados falsos positivos:

- Uso de instrumental exclusivo para PCR.
- Utilización de reactivos y tubos estériles.
- Uso de guantes del manipulador.
- No usar un alto número de ciclos, normalmente el número de ciclos es de 25-30.
- La concentración de dNTPs debe ser igual para los cuatro.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- El ADN no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de los que queremos amplificar, tampoco deben existir trazas de alcohol que pueden inhibir la actividad de la polimerasa.
- Cantidad de la muestra (El mínimo oscila entre 10-100 ng. y el máximo entre 400-500 ng.).

Tomando en cuenta lo antes mencionado en un tubo para PCR de 200 µl se agregaran los siguientes reactivos:

Reactivo	µl	Reactivo	µl
Agua Estéril	66.5	Agua Estéril	66.5
pEGFP (Templado) 20ng	1	pEGFP (Templado) 20 ng	1
SMC-1 EGFP-AS 0.1µg/µl	1	SMC-1 EGFP-KDEL-AS 0.1µg/µl	1
SMC-1 SENSE 0.1 µg/µl	1	SMC-1 SENSE 0.1µg/µl	1
Buffer 10X Taq. Pol. Alta Fidelidad	10	Buffer 10X Taq. Pol. Alta Fidelidad	10
dNTPs 1.25 mM	16	dNTPs 1.25 mM	16
MgSO ₄ 50 mM	4	MgSO ₄ 50 mM	4
Enzima Taq. Pol. Alta Fidelidad	0.5	Enzima Taq Pol Alta Fidelidad	0.5
Total	100	Total	100

La enzima polimerasa utilizada fue la PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity Cat. No. 11304-011; Lot. No. 1098121; GIBCO BRL.

Condiciones de PCR.		
94°C	3'	1 ciclo
94°C	2'	30 ciclos
60°C	1'	
72°C	2'	
72°C	10'	1ciclo

8.4. Purificación del producto de PCR

Este protocolo describe el método más comúnmente usado para purificar y concentrar preparaciones de ADN.

Para verificar nuestra amplificación se corrió una alícuota de 10 µl de cada muestra en un gel de agarosa TBE al 1%. Posteriormente se precipitó el restante de la reacción de PCR con $\frac{1}{10}$ de volumen de acetato de sodio 3 M mas 2.5 volúmenes de etanol absoluto; se dejó a -70°C por 20', se centrifugó 12,000 rpm/15 min/4°C, se lavó con etanol al 70% y finalmente se centrifugó 12,000 rpm/10 min/4°C, se secó perfectamente y se resuspendió en 10 µl finales de TE.

8.5. Electroforesis verticales de ADN en geles de agarosa (Sambrook y col., 1989).

El objetivo de la electroforesis es determinar el peso de una cadena de ADN basándose en el principio que cuando una corriente eléctrica pasa a través del gel, el ADN se desplazará a través del gel en una relación que es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

Esto quiere decir que las bandas de ADN más cortas (con un peso molecular menor), migraran más rápido que las bandas de ADN más largas (con un peso molecular mayor).

Para facilitar la identificación del ADN, éste se tiñe con una solución de azul de bromuro de etidio, también se usan los colorantes, azul de brofenol, xilencianol, para indicar el grado de corrimiento durante la electroforesis. El bromuro de etidio indica la posición exacta del ADN cuando este es expuesto a la luz ultravioleta ya que se intercala entre las bases nucleotídicas de ADN.

Es importante incluir siempre un estándar de peso molecular para indicar el peso de cada banda de ADN que se desea observar. A continuación se muestran los marcadores utilizados en este trabajo.

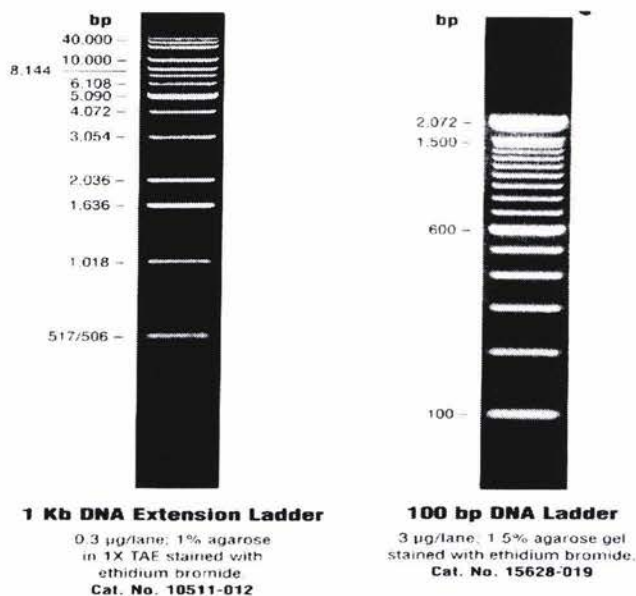


Figura 5. Marcadores Moleculares, GIBCO BRL

Para preparar el gel se disolvió la cantidad de agarosa necesaria a la concentración deseada en solución TBE 1X; después se calentó hasta disolver y se vertió en un vidrio al cual se le colocó un peine para hacer pozos (el no. de pozos depende de las muestras). Posteriormente ya que se polimerizó el gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 1X.

El ADN se mezcló con buffer de muestra y se colocó en los pozos, se corrió a 99 volts, se tiñó con bromuro de etidio al 1%, se lavó con agua milliQu durante 10' y finalmente se tomó la fotografía en un analizador de imágenes.

8.6. Obtención de células calcio competentes

Este tratamiento prepara la pared bacteriana para facilitar la entrada de ADN de plásmido por un mecanismo no dilucidado.

La preparación de las bacterias calcio competentes es un proceso muy delicado en el que hay que cuidar diferentes factores como el usar bacterias en fase logarítmica de crecimiento y temperaturas bajas de 4°C durante todo el procedimiento.

El rendimiento de la transformación es un reflejo de la eficiencia que las células competentes tienen para ser transformadas por el ADN de plásmido. Para calcular el rendimiento se necesita previamente purificar y cuantificar un plásmido control.

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{No. de colonias}}{\text{DNA (ng)}} \text{ (factor de dilución)}$$

Para lograr una transformación exitosa la eficiencia de las células competentes debe de encontrarse dentro de los límites establecidos (10^7 y 10^8 transformantes/ μg ADN).

Tomando en cuenta lo antes mencionado se inoculó una colonia bacteriana fresca en 20 ml de medio LB en un matraz de 250 ml y se dejó toda la noche con agitación constante (250 rpm) a 37°C. De este cultivo se tomó 2 ml y se pusieron en un matraz de 250 ml con 20 ml de medio TYM, en este paso el cultivo se dejó crecer hasta que se observó una D.O. entre 0.2-0.8. Se colocó todo el cultivo anterior en un matraz de 2 lt con 100 ml de medio TYM y se dejó incubar a una D.O. entre 0.5 a 0.9. Se agregó medio TYM hasta obtener 500 ml finales y se dejó crecer hasta que alcanzó una D.O. de 6.0 (esta lectura debe ser exacta ya que cualquier variación influye de manera considerable en la eficiencia de las células); el cultivo se colocó inmediatamente dentro de hielo – agua. El cultivo se centrifugó 4000 rpm /15 min/4°C posteriormente se desechó el sobrenadante se resuspendió muy suavemente en 100ml de la solución TFBI. Después se centrifugó a 4000 rpm/ 8min./ 4°C, se desechó el sobrenadante se resuspendió muy suavemente en 20 ml de la solución TFBII. Se pusieron alícuotas en tubos eppendorf y se congelaron en hielo seco-etanol, finalmente las células se almacenaron en un ultra congelador a -70°C. Posteriormente las células se transformaron con diferentes concentraciones de ADN de plásmido (0.1, 1.0 y 10 ng) para determinar su eficiencia de transformación.

NOTAS:

Los cultivos se incubaron a 37°C y en agitación (250 rpm).

Todo el procedimiento después de haber alcanzado la D.O. de 6.0 se hizo en el cuarto a 4°C con todas las soluciones y material pre-enfriado.

Las células se resuspendieron con agitación suave (sin utilizar vortex, o pipeta).

Para que la eficiencia de transformación fuere alta, el método de congelado (nitrógeno líquido o hielo seco-etanol) así como el choque térmico en la transformación (37°C/5 min o 42°C/1.5 min), fue evaluado en cada cepa bacteriana.

Las cepas que se prepararon son DH10B para la primer construcción y la SURE para la segunda construcción.

8.7. Transformación de las células calcio competentes

La transformación de las células calcio competentes consistió en la introducción del ADN y las bacterias calcio competentes y la posterior introducción del ADN mediante un choque térmico.

En un tubo de vidrio se agregaron diferentes cantidades de ADN (dependiendo de lo que se este transformando), 100 μ l de solución TFBII y 50 μ l de células; se dejaron en hielo a 4°C durante 10 min. Hasta este paso todo se hizo con material y reactivos preenfriados y en el cuarto a 4°C. Posteriormente se le dio un choque térmico a 37°C/ 5 min (esta condición varió a 42°C/ 1.5 min dependiendo de la cepa bacteriana usada). Se agregó 1 ml de medio de cultivo LB y se incubó a 37°C en agitación por 1 h; finalmente se plaqueó en cajas de medio LB agar + 100 μ g/ml de ampicilina (300 μ l de ligación/ placa) y se dejó a 37°C por 24 h.

NOTA:

En la segunda construcción el choque térmico se modificó a 42°C/ 1.5 min y al momento de cualquier incubación se dejó a 30°C para evitar recombinación de las secuencias repetidas de nuestras construcciones. Por otra parte a las cajas de medio LB agar + 100 μ g/ml de ampicilina se les adicionó 40 μ l de X Gal 20 mg/ml y 4 μ l de IPTG 20 mg/ml (1M).

8.8. Extracción de ADN de plásmido (Ausubel y col., 1999).

Los ADNs de plásmido fueron purificados de cultivos líquidos conteniendo el antibiótico de selección. Existen diferentes métodos de extracción y purificación de ADN de plásmido de acuerdo a la pureza y cantidad de ADN deseada a obtener. En este trabajo se utilizaron tres:

- 1) STET PREP (miniprep). Este procedimiento es recomendado para preparar pequeñas cantidades de ADN de plásmido cuando se desean analizar una gran cantidad de clonas positivas a la resistencia al antibiótico usado en la selección.

Se inoculó una colonia en 5 ml de LB + 100 μ g/ml de ampicilina. y se dejó incubando toda la noche. Del cultivo anterior se tomó 1.5 ml, se centrifugó a 12,000 rpm/30 seg se desechó el sobrenadante y se le agregaron a la pastilla 350 μ l de solución STET. Se mezcló en vortex hasta disolver la pastilla y se le adicionó 25 μ l de lisozima fresca (10 mg/ml). El tubo se colocó 40 seg (exactos), en agua hirviendo. Posteriormente se centrifugó 12,000 rpm/10 min./T. amb. se recuperó el sobrenadante, se le añadió 40 μ l de acetato de sodio 2.5 M y 420 μ l de isopropanol y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó 12,000 rpm/15 min/4°C., la pastilla se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 12,000 rpm/15 min/4°C., se dejó secar para finalmente resuspender en 25 μ l de agua o solución TE y almacenar a 4°C.

- 2) Lisis Alcalina. Este es un método que permite la obtención de ADN razonablemente limpio y en buena cantidad permitiendo que el ADN extraído pueda ser utilizado para reacciones y clonaciones posteriores.

Se inoculó una colonia en 20 ml de LB + 100 µg/ml de ampicilina, se incubó a 37°C por 24 h. Se centrifugó 10 ml del cultivo anterior a 4000 rpm/10 min/4°C. Se resuspendió en 200 µl de solución I. Se adicionó 400 µl de solución II, se mezcló por inversión varias veces hasta que la suspensión se vio translúcida, se dejó reposar 5 min en hielo, se agregó 300 µl de solución III y se colocó en hielo de 3-5 min. Se centrifugó a 12000 rpm/5 min/4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml, se agregó 2 µl de RNasa y se incubó a 37°C/2 h; posteriormente se agregó volumen a volumen fenol-cloroformo isoamílico; se agitó hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, se centrifugó a 12,000 rpm/5 min/4°C, la fase acuosa se separó de la fase orgánica para transferirla a un tubo nuevo, se le agregó un volumen igual de isopropanol y se dejó a temperatura ambiente 20 min. Después se centrifugó 12,000 rpm/5 min/4°C, la pastilla obtenida se lavó en 1 ml de etanol al 70%. La pastilla se secó al vacío con centrífuga en un concentrador Savant (speedvac ADNHO), y finalmente se resuspendió en 100 µl de TE.

- 3) CsCl/Bromuro de Etidio. Este procedimiento se utiliza para extraer gran cantidad de ADN con alta pureza además de permitir la separación de ADN circular y cortado en una sola cadena (*nicked*).

Se inoculó una colonia en 10 ml de LB + 100 µg/ml de ampicilina y se dejó a 37°C t. el día. Del cultivo de todo el día se tomaron 5 ml y se pusieron en un matraz de 1 lt. más 500 ml de LB + 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron a 37°C t. la noche. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm (rotor GSA)/10 min/4°C se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TS después se le agregaron 4 ml de solución ELT y se colocaron a 70°C/10 min exactos. Pasados los 10 min se centrifugó a 40,000 rpm/20 min/20°C (rotor SW40Ti), se recuperó el sobrenadante y se le agregó volumen a volumen solución PEG-NaCl y se dejó 30 min. a temp. amb. Se centrifugó a 7,000 rpm/10 min/4°C (rotor GSA), se resuspendió en 3 ml de solución TE, se adicionó 25 µl de RNasa (5 µg/ml) y se incubó a 37°C aproximadamente 4 h. Posteriormente se agregaron 4 g de Cloruro de Cesio + 500 µl de Bromuro de Etidio (5 mg/ml). Se centrifugó a 90,000 rpm/14 h aprox./20°C (rotor STV90). Con la ayuda de la luz U.V. se recuperó la banda de ADN circular, se le agregó volumen a volumen isopropanol para quitar todo el Bromuro de Etidio tantas veces como sea necesario (aprox. 3 o 4), se agregaron tres volúmenes de etanol al 70 % y se dejó a -20°C t. la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm/10 min/4°C, se resuspendió en TE y se extrajo volumen a volumen con fenol-cloroformo. Se centrifugó a 12,000 rpm/1 min y recuperó la fase superior (dos veces). Se agregó 1/10 de acetato de sodio 2.5 M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -70°C/20 min. Finalmente se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 12.000 rpm/ 5 min y se resuspendió en TE.

8.9. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción, o enzimas de restricción, son usadas para cortar ADN en secuencias específicas, realizando un corte cohesivo (corte segmentado que libera dos extremos de ADN que son complementarios) o rasurado (corte lineal).

Las enzimas de restricción son útiles por varias razones: (1) Tienen únicamente actividad de restricción. (2) Cada corte es predecible y de manera consistente dentro del sitio o adyacente a la secuencia de reconocimiento. (3) Éstas solo requieren del ion magnesio (Mg^{++}) como cofactor y no de ATP.

Desde un punto de vista general, todas las enzimas de restricción necesitan “anclarse o fijarse” previamente a la cadena de ADN para reconocer o cortar en un sitio dado. Este “anclaje” depende del tipo de enzima requiriendo entre 5 y 20 pb para unirse.

Para crear sitios de corte cohesivo en los insertos y el vector, se realizaron las siguientes digestiones.

Digestión con *BamH* I y *Kpn* I.

Digestión con <i>BamH</i> I	
Reactivo	μ l
ADN <i>EGFP</i> o <i>EGFP</i> -KDEL(PCR)	5
BSA 10X	2
NEBuffer <i>BamH</i> I 10X	2
Enzima <i>BamH</i> I	2
H ₂ O estéril	9
Total	20

Digestión con <i>BamH</i> I	
Reactivo	μ l
ADN pA5'NeoA3' (Lisis Alcalina)	20
BSA 10X	4
NEBuffer <i>BamH</i> I 10X	4
Enzima <i>BamH</i> I	4
H ₂ O estéril	68
Total	100

La digestión se incubó a 37°C aproximadamente 2 h o más. Posteriormente se inactivó la enzima *BamH* I por calor a 80°C/20 min para evitar efecto estrella (la enzima corta en otros sitios) cuando se puso la enzima *Kpn* I; ya que los buffers de las enzimas no son compatibles. Posteriormente se precipitó con $1/10$ de acetato de sodio mas 2.5 volúmenes de etanol absoluto; se dejó a -70°C por 20 min, se centrifugó 12,000 rpm/15 min/4°C se lavó la pastilla con etanol al 70% por 20 min, se centrifugó 12,000 rpm/15 min/4°C y se secó la pastilla al vacío con centrifugación en un concentrador Savant (speedvac ADNHO) y finalmente se resuspendió en 4 μ l de H₂O estéril para *EGFP*, *EGFP*-KDEL y 78 μ l para pA5'NeoA3'.

Digestión con <i>Kpn</i> I	
Reactivo	µl
ADN <i>EGFP</i> o <i>EGFP</i> - KDEL ^c / <i>Bam</i> H I	4
BSA 10X	2
NEBuffer 1 10X	2
Enzima <i>Kpn</i> I	2
Total	10

Digestión con <i>Kpn</i> I	
Reactivo	µl
ADN pA5'Neo3' A ^c / <i>Bam</i> H I	78
BSA 10X	4
NEBuffer 1 10X	4
Enzima <i>Kpn</i> I	4
Total	100

Para comprobar la correcta inserción y orientación del gen clonado, en las construcciones pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' se realizaron las siguientes digestiones:

Digestión con <i>Nco</i> I + <i>Bam</i> H I	
Reactivo	µl
ADN pA5'EGFPA3' o pA5'EGFP-KDELA3' (miniprep)	5
BSA 10X	1
NEBuffer <i>Bam</i> H I 10X	1
Enzima <i>Bam</i> H I	1
H ₂ O estéril	2
Total	10

Digestión con <i>Nco</i> I + <i>Kpn</i> I	
Reactivo	µl
ADN pA5'EGFPA3' o pA5'EGFP-KDELA3' (miniprep)	5
BSA 10X	1
NEBuffer 1 10X	1
Enzima <i>Kpn</i> I	1
H ₂ O estéril	2
Total	10

Digestión con <i>Nco</i> I + <i>Eco</i> R I	
Reactivo	µl
ADN pA5'EGFPA3' o pA5'EGFP-KDELA3' (miniprep)	5
NEBuffer <i>Eco</i> R I 10X	1
Enzima <i>Eco</i> R I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

Digestión con <i>Nco</i> I + <i>Xba</i> I	
Reactivo	µl
ADN pA5'EGFPA3' o pA5'EGFP-KDELA3' (miniprep)	5
BSA 10X	1
NEBuffer 2 10X	1
Enzima <i>Xba</i> I	1
H ₂ O estéril	2
Total	10

Para extraer las regiones A5'EGFPA3' (1800 pb), A5'EGFP-KDELA3' (1815 pb) y A5'NeoA3' (1872 pb) se digirieron las primeras construcciones y el plásmido donde se encuentra la secuencia de pA5'NeoA3'; con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I.

Digestión con <i>EcoR</i> I + <i>Xba</i> I	
Reactivo	μl
ADN pA5'EGFPA3' o pA5'EGFP-KDELA3' o pA5'NeoA3' (Lisis Alcalina)	5
NEBuffer H	1
Enzimas <i>EcoR</i> I y <i>Xba</i> I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

El vector pBS (+/-) donde se clonaron los fragmentos antes mencionados se digirió con la enzima *Xba* I.

Digestión con <i>Xba</i> I	
Reactivo	μl
ADN pBS (+/-) 1μg/μl	5
BSA 10X	1
NEBuffer 2	1
Enzima <i>Xba</i> I	1
H ₂ O estéril	2
Total	10

Para comprobar la correcta inserción y orientación del gen clonado, en las construcciones pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' se realizaron las siguientes digestiones:

Digestión con <i>Pst</i> I	
Reactivo	μl
ADN pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' o pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (miniprep)	5
NEBuffer H	1
Enzima <i>Pst</i> I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

Digestión con <i>Sph</i> I	
Reactivo	μl
ADN pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' o pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (miniprep)	5
NEBuffer M	1
Enzima <i>Sph</i> I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

Digestión con <i>Nco</i> I	
Reactivo	μl
ADN pA5'EGFPA3'- A5'NeoA3' o pA5'EGFP- KDELA3'- A5'NeoA3' (miniprep)	5
NEBuffer 4	1
Enzima <i>Nco</i> I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

Digestión con <i>Xba</i> I	
Reactivo	μl
ADN pA5'EGFPA3'- A5'NeoA3' o pA5'EGFP- KDELA3'- A5'NeoA3' (miniprep)	5
NEBuffer H	1
Enzima <i>Xba</i> I	1
H ₂ O estéril	3
Total	10

8.10. Purificación de ADN de geles de agarosa

Se corrieron los fragmentos de ADN que se deseaban purificar en un gel de agarosa TAE al 1% en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a 60 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio cubierto de la luz y finalmente se cortó la banda de interés con la ayuda del transiluminador de luz U.V.

El ADN se purificó con el protocolo del kit de QUIAGEN Cat. No. 28704:

Se pesó el fragmento de gel de agarosa conteniendo el fragmento de ADN deseado y se hizo la conversión de gramos a mililitros asumiendo que 1 mg es igual a 1 μl. Se le agregó tres veces el peso de agarosa en μl de buffer QG y se incubó a 50°C por 10 min. hasta que la agarosa se disolvió completamente. Se comprobó que el color de la mezcla fuera amarillo; cuando el color fue naranja o violeta se adicionó 10 μl de acetato de sodio 3M pH 5.0 y se mezcló hasta que el color se tornó amarillo. Se colocó la mezcla en una columna QUIAGEN y se centrifugó por 1min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se adicionó 0.5 ml de buffer QG a la columna y se centrifugó por 1min a 13,000 rpm eliminando así los restos de agarosa. La columna se lavó con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por 1min. a 13,000 rpm (antes de centrifugar se dejó de 2 a 5 min en el buffer si el ADN se utilizó en ligaciones o secuenciación). Se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar para desechar todos los residuos de etanol. Finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml para eluir el ADN adicionando 50 μl de buffer EB, se dejó 1 min y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. El ADN purificado se almacenó a -20°C.

8.11. Ligación (Ausubel y col., 1999).

La clonación consiste en insertar un segmento de ADN de interés dentro de un vector de clonación para obtener grandes cantidades del vector recombinante.

La generación de clonas recombinantes usualmente involucra unir covalentemente (ligación) dos o más fragmentos los cuales han sido digeridos previamente. La ligación se lleva a cabo con la enzima T4 ADN ligasa, la cual es producida por el fago T4 ADN ligasa de *E. coli*, requiriendo para su actividad Mg^{++} y ATP como cofactores. La ligasa formara dos uniones covalentes dando como resultado un único fragmento de doble cadena.

El vector de clonación usado en este trabajo es una molécula de ADN de forma circular denominado plásmido. Los plásmidos que han sido construidos para clonación molecular son relativamente pequeños (2.5 a 4.0 Kb), contienen un origen de replicación (ori) para mantener su estado autónomo, un marcador de selección, necesario para mantener la presencia del plásmido en la célula y contiene un *polilinker* o sitio múltiple de clonación (MCS), que es un segmento pequeño de corte con sitio unico para una gran variedad de endonucleasas de restricción en el cual el ADN de interés puede ser insertado sin interferir en la habilidad que tiene el plásmido para replicarse o para conferirle el fenotipo de selección al hospedero.

El plásmido utilizado en la primera construcción contenía la secuencia del promotor de actina de *E. histolytica* en la región flanqueante 5' (A5') y la secuencia para la poliadenilación del gen de actina de *E. histolytica* en la región flanqueante 3' (A3') y la secuencia que codifica para el gen de Neomicina la cual es una droga de selección; clonados en el vector pBS+/- . Esta construcción consistió en remplazar la secuencia de Neo por la de la *EGFP* o *EGFP-KDEL* para obtener los plásmidos pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3'.

En la segunda construcción se clonaron los fragmentos A5'EGFPA3' + A5'NeoA3' , A5'EGFP-KDELA3' + A5'NeoA3' en el vector pBS+/- para obtener los plásmidos pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'.

La clonación de los fragmentos *EGFP* o *EGFP-KDEL* amplificados por PCR en el vector pA5'__A3' así como un control que fue el vector sin inserto se ligaron bajo las siguientes condiciones:

Ligación (<i>EGFP</i> o <i>EGFP-KDEL</i>) + pA5'__A3'	
Reactivo	μl
ADN <i>EGFP</i> o <i>EGFP-KDEL</i> (PCR) (2:1 inserto:vector)	5
ADN pA5'__A3'	2
ATP	1
Buffer 10X T4 ADN Ligasa	1
T4 ADN Ligasa	0.5 + 0.5
Total	10

Control	
Reactivo	μl
ADN pA5'__A3' (lisis alcalina)	2
ATP	1
Buffer 10X T4 ADN Ligasa	1
T4 ADN Ligasa	0.5 + 0.5
H ₂ O estéril	5
Total	10

La T4 ADN ligasa se adicionó en dos ocasiones: al inicio de la reacción, y después de haber incubado 5 h a 16°C. La segunda ocasión incubó toda la noche a para asegurar la ligación.

Los fragmentos *A5'EGFPA3' + A5'NeoA3*, *A5'EGFP-KDELA3' + A5'NeoA3*, se ligaron en el vector pBS (+/-) bajo las siguientes condiciones.

Ligación (<i>A5'EGFPA3'</i> o <i>A5'EGFP-KDELA3'</i>) + <i>A5'NeoA3'</i> + pBS (+/-)	
Reactivo	µl
ADN (<i>A5'EGFPA3'</i> o <i>A5'EGFP-KDELA3'</i>) + <i>A5'NeoA3'</i> + pBS (+/-) (1:1:1)	7
ATP	1
Buffer 10X T4 ADN Ligasa	1
T4 ADN Ligasa	1
Total	10

NOTAS:

Las muestras se precipitaron (con la misma técnica con la que se precipitaron los PCR) para concentrar y resuspender directamente en la mezcla de ligación con las siguientes cantidades:

-20 µl *A5'NeoA3'* (lisis alcalina) + 40 µl *A5'EGFPA3'* (lisis alcalina) + 0.5 µl de vector pBS +/- (1µg/µl) (1:1:1).

-20 µl *A5'NeoA3'* (lisis alcalina) + 40 µl *A5'EGFP-KDELA3'* (lisis alcalina) + 0.5 µl de vector pBS +/- (1µg/µl) (1:1:1).

Se dio un choque térmico a la reacción a 50°C por 30 seg. antes de agregar la enzima para eliminar estructuras secundarias que pudieran bloquear o disminuir la eficiencia de la ligación.

Finalmente la reacción, ya con la enzima, se dejó 20 min. a temperatura ambiente y se transformaron 5 µl de cada una de las ligaciones plaqueando el total de la transformación usando 300 µl/placa en LB+ ampicilina.

La enzima utilizada fue la T4 ADN Ligasa No. M0202S Lot. No. 71; BioLabs.

8.12. PCR de la colonia bacteriana

Se tomaron varias colonias aisladas (con la ayuda de palillos) de las placas donde se transformaron las ligaciones *EGFP + pA5' ___A3'* y *EGFP-KDEL + pA5' ___A3'* con el fin de verificar que el inserto corresponde al gen amplificado por PCR. El palillo se lavó en

10 μ l de agua estéril y lo que queda adherido en el palillo se volvió a sembrar en una caja de LB + ampicilina 100 μ g/ml.

Se utilizaron 3.4 μ l de la solución anterior y se le agregó 1.6 μ l de la mezcla madre siguiente:

Reactivo	μ l
Agua Estéril	20
SMC-1 EGFP-SCAS 0.1 μ g/ μ l	1
SMC-1 SENSE 0.1 μ g/ μ l	1
Buffer 10X Taq. Pol.	10
dNTPs 1.25mM	16
Enzima Taq. Pol.	0.5
Total	50

Se preparó un control positivo (aprox. 40 ng de plásmido de la proteína verde fluorescente) y un control negativo (aprox. 40 ng de plásmido que se utilizó como vector pA5'NeoA3') mas 1.6 μ l de la mezcla madre.

Posteriormente las muestras problema y los controles se sometieron al siguiente ciclo en la maquina de PCR:

Condiciones de PCR.		
94°C	3'	1 ciclo
94°C	2'	30 ciclos
60°C	1'	
72°C	2'	
72°C	10'	1ciclo

Finalmente las muestras se corrieron en geles de agarosa para analizar si se amplificó la secuencia de interés.

8.13. Cuantificación espectrofotométrica de ADN

Para cuantificar la cantidad de ADN y su pureza se determinó la D.O de cada muestra a una longitud de onda de 260 nm y a 280nm. Una D.O. de 1 corresponde a aproximadamente 50 μ g/ml de ADN de doble cadena, 40 μ g/ml de ADN de cadena sencilla y aproximadamente 20 μ g/ml para oligonucleótidos de cadena sencilla. El ratio de las lecturas de 260nm/280nm=1.8 indica que el ADN es puro. Las muestras de ADN se diluyeron 1:1000 μ l con agua y se realizó la lectura en una cubeta de cuarzo. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS "Beckman" a la longitudes de onda antes descritas.

6.14. Transfección de amibas con pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' con Fosfato de Calcio

Después de haber clonado el gen de interés en el vector de expresión deseado, se analizó la expresión de la proteína *EGFP* y la quimera *EGFP-KDEL*, después de su transfección a los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS.

Hay dos tipos de transfecciones (descritos en células de mamíferos) transitoria y estable o permanente. En una transfección transitoria, la transcripción del gen puede ser analizado entre 1 y 4 días después de haber introducido el ADN. Por otro lado, muchos experimentos requieren la formación de líneas celulares que contengan el gen(s) los cuales son integrados dentro del ADN cromosomal dando como resultado una transfección estable o permanente.

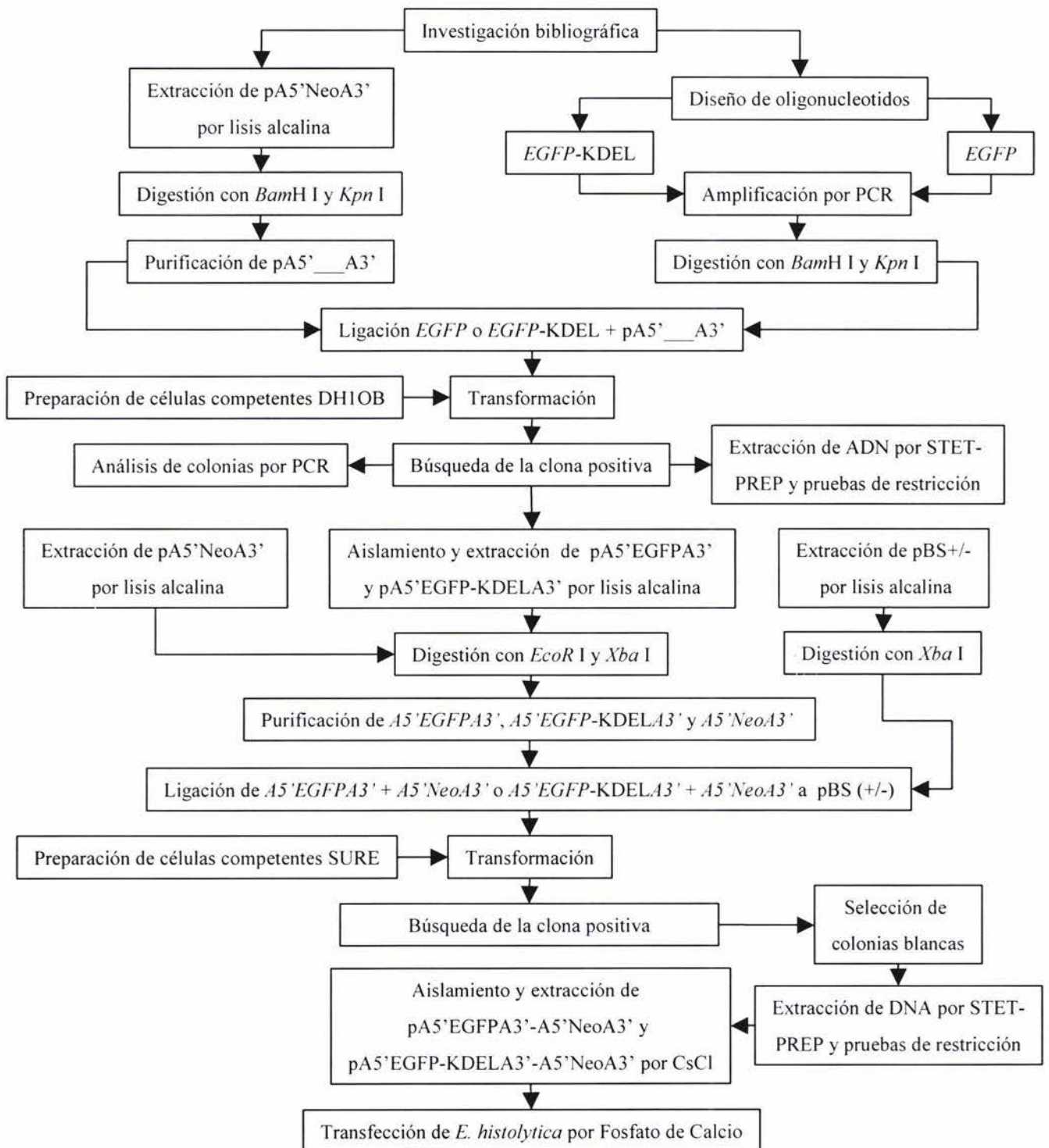
Podemos considerar dos grandes grupos de técnicas de transfección: 1) Métodos físicos que se basan en el uso de sistemas mecánicos, no biológicos, para lograr la inserción de material genético en las células. Los principales son: Electroporación y Microinyección. 2) Métodos químicos basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextrano) o a las membranas (lipofección).

El método del fosfato cálcico esta basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. En esta situación co-precipitan formando unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células. Aparentemente el agregado de calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso.

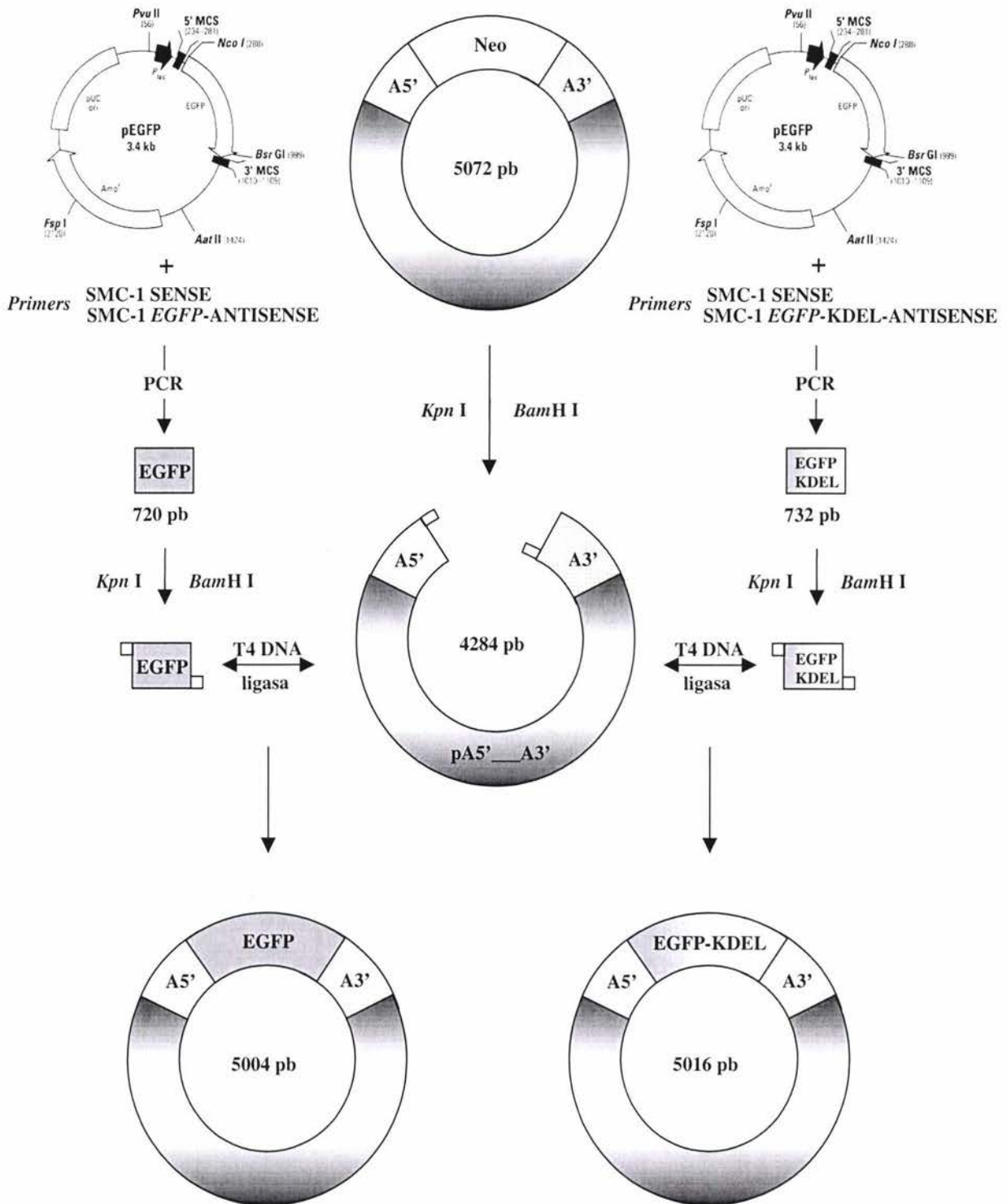
Se precipitaron 40 µg de ADN, se le agregó 16 µl de agua estéril, 100 µl de CaCl₂ (0.25 M) y se le agregó lentamente con agitación continua 100 µl de HBS (2X). Se dejo de 20 a 30 min a temp. amb. Finalmente se le agregó a una caja de cultivo con 1X10⁶ amibas (un tubo confluyente) en un volumen final de 40 ml de medio y se dejo a 37°C. Después de 24 h se adicionó la droga G418 (análogo de Neomicina) a una concentración 5 µg/ml en el medio de cultivo. Posteriormente a las 32 h de haber agregado la droga se tomó una alícuota de 1 ml de la caja del control y de las que tiene el ADN, se centrifugaron por 2 a 3 seg a 12,000 rpm y se lavaron con PBS al 1X, (este paso se repitió una vez más) para evitar la auto-florescencia del medio de cultivo TY1-S-33. Finalmente las amibas se observaron en un microscopio de fluorescencia "Olimpus" y se tomaron las imágenes con ayuda del Software Twin Viewfinder, version 3.0 y fueron procesadas con el Software Image-Pro Plus, versión 4.0.

9

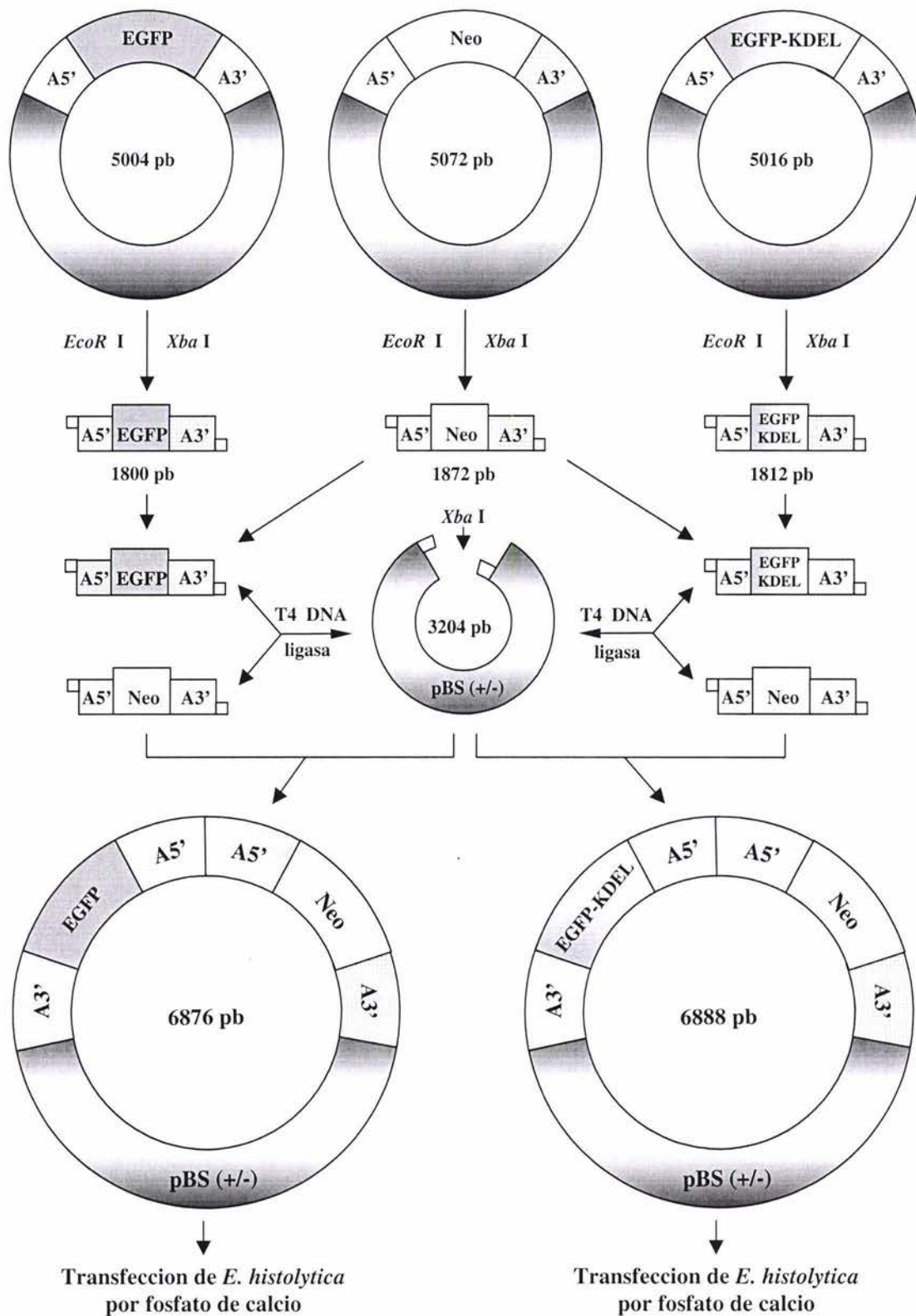
DIAGRAMA EXPERIMENTAL



10 ESQUEMA EXPERIMENTAL 1



11 ESQUEMA EXPERIMENTAL 2



12

RESULTADOS

12.1. Construcción de los vectores de transfección pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3'

Como se dijo anteriormente el objetivo del presente proyecto es la expresión, en trofozoítos de *E. histolytica*, de la proteína verde fluorescente (*EGFP*) y de esta proteína fusionada a una secuencia KDEL que dirigirá a la *EGFP* al Retículo Endoplásmico (*EGFP-KDEL*). Por ello como un primer paso se construyeron dos vectores de transfección en donde la expresión de estas secuencias esta bajo el promotor de actina de *E. histolytica*.

Siguiendo la estrategia experimental descrita anteriormente como se muestra en la figura No. 6, en un primer paso se amplificaron por PCR los fragmentos de ADN conteniendo la secuencia que codifica para *EGFP* y *EGFP-KDEL* como se describió en materiales y métodos.

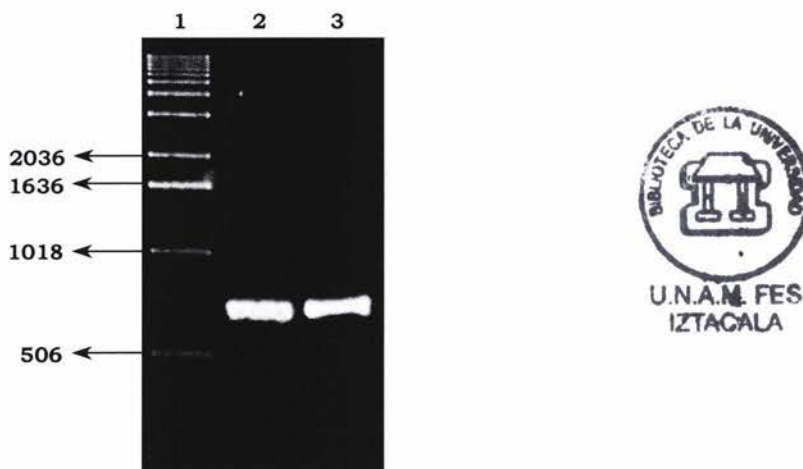


Figura 6

Figura 6. Amplificación de la secuencia que codifica para EGFP y EGFP-KDEL por PCR

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) Producto de amplificación de la secuencia que codifica para EGFP (10µl) y 3) Producto de amplificación de la secuencia que codifica para EGFP-KDEL (10 µl). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

IZT.

Los productos de amplificación obtenidos correspondieron a 720 pb para la *EGFP* y 732 pb para la *EGFP-KDEL* correspondiendo al peso molecular esperado. Ambas bandas migraron de manera similar ya que la resolución del gel de agarosa al 1% no permite detectar diferencias tan pequeñas de peso molecular.

Los productos de PCR se precipitaron y se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *Kpn* I en el extremo 5' y *Bam*H I en su extremo 3' de *EGFP* y *EGFP*-KDEL, produciendo extremos cohesivos en ambos lados de los fragmentos de amplificación para su posterior clonación en el vector de expresión.

Por otro lado el ADN de pA5'NeoA3' de 5076 pb (Figura No. 7) extraído por lisis alcalina, fue digerido con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Bam*H I, liberando un fragmento de 792 pb correspondiente a la secuencia que codifica para Neomicina (*Neo*) y otro de 4284 pb correspondiente a la secuencia del vector pBS (+/-) junto con las secuencias de los extremos flanqueantes 5' y 3' del gen de actina de *E. histolytica* (pA5'__A3') como se muestra en la Figura No. 8. Una vez verificado que se obtuvo la digestión completa del ADN, el total de la digestión se corrió en un gel de agarosa preparativo TAE para la posterior purificación del fragmento de 4284 pb (pA5'__A3') utilizando el kit de QIAGEN como se describe en materiales y métodos. Para verificar la integridad y pureza del fragmento de 4284 pb purificado, una alícuota de la muestra se corrió en un gel de agarosa como se muestra en la Figura No. 9. Como se observa se obtuvo una banda de 4284 pb confirmando que se obtuvo el vector sin la secuencia de Neomicina.

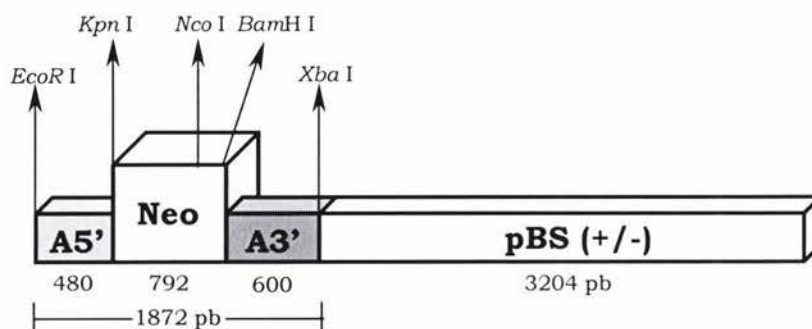


Figura 7

Figura 7. Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'NeoA3' (*Eco*R I, *Kpn* I, *Nco* I, *Bam*H I y *Xba* I)

La barra sin relleno pequeña corresponde al esqueleto del vector. Las barras con relleno pequeñas corresponden a las secuencias A5' (promotor de actina de *E. histolytica*) y A3' (secuencias para la poliadenilación de actina de *E. histolytica*). La barra sin relleno grande corresponde a la secuencia que codifica a Neomicina. Los sitios únicos de restricción y los tamaños de cada fragmento están indicados arriba y abajo del esquema del vector respectivamente. Por facilidad de dibujo se esquematiza el plásmido lineal cortado con *Eco*R I.

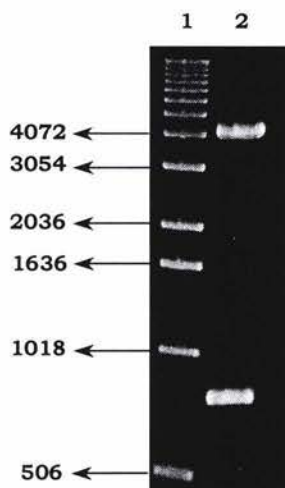


Figura 8

Figura 8. Digestion de pA5'NeoA3' con *Kpn* I y *Bam*H I

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3 μ l), 2) pA5'NeoA3' digerido con *Kpn* I y *Bam*H I. A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.



Figura 9

Figura 9. pA5'__A3' purificado

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3 μ l), 2) Fragmento pA5'__A3' purificado de 4284 pb (2 μ l). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

Ya que contábamos tanto con el vector (pA5'__A3') como con los insertos (*EGFP* y *EGFP*-KDEL) digeridos con *Kpn* I y *Bam*H I y purificados, procedimos a la ligación de estos para obtener las construcciones pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' (Figura No. 14). Después de transformar células competentes DH10B (con una eficiencia de transformación de $1.2 \times 10^7/\mu\text{g}$ de ADN) con la ligación anterior y plaquear en placas de LB + Ampicilina se obtuvieron varias colonias resistentes al antibiótico. Se seleccionaron para análisis de PCR de colonia, 29 y 20 colonias de pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' respectivamente, obteniéndose en el primer caso 10 colonias positivas que corresponden a un 34.5% de eficiencia de clonación y 15 colonias positivas para el segundo caso que corresponde a un 75% de eficiencia de clonación. Este resultado se muestra en la Figura No.10 para pA5'EGFPA3' en la que se observa un producto de amplificación de 720 pb y en la Figura No. 11 para pA5'EGFP-KDELA3' en la que se observa un producto de amplificación de 732 pb, mostrándose en cada caso un gel representativo del experimento completo. Para verificar la confiabilidad del resultado se utilizó un control negativo en el que se usó como templado el ADN del vector pA5'NeoA3' y un control positivo en el que se usó como templado el ADN del plásmido pEGFP. Como era de esperarse no se obtuvo producto de amplificación en el control negativo (Figura No.10 carril 8) y una banda de 720 pb en el control positivo (Figura No.10, carril 7) correspondiente a la amplificación de la secuencia que codifica a la proteína *EGFP*.

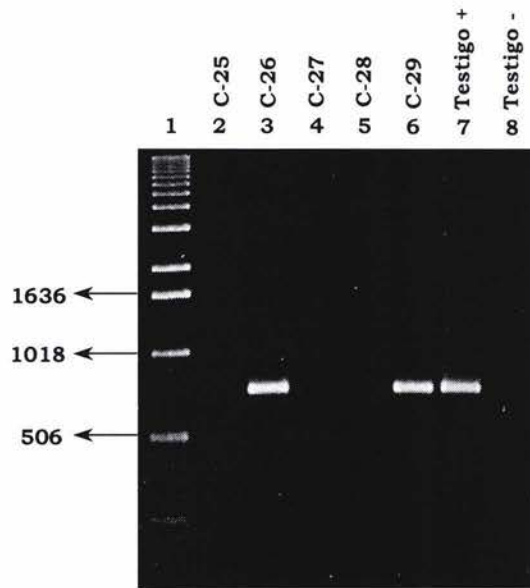


Figura 10

Figura 10. Análisis de PCR de colonia para pA5'EGFPΔ3'

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3μl). 2 al 6) clonas (25 a 29) resistentes al antibiótico. 7) Testigo positivo en donde se uso ADN de pEGFP como templado (5μl). 8) Testigo negativo en donde se uso ADN de pA5'NeoA3' como templado (5μl). Como se puede observar las clonas 26 y 29 son positivas en esta prueba. A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

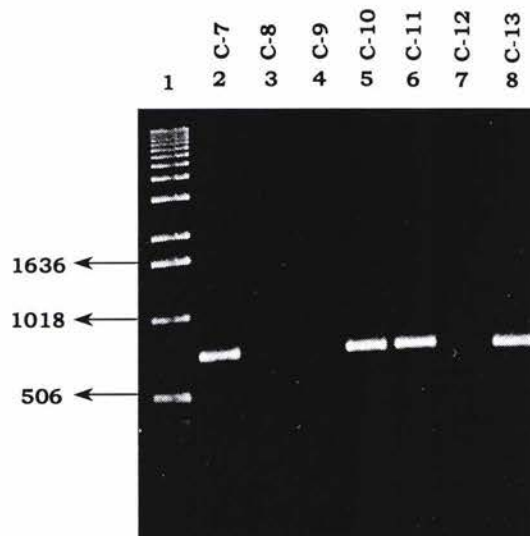


Figura 11

Figura 11. Análisis de PCR de colonia para pA5'EGFP-KDELA3'

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3μl). 2 al 8) clonas (7 a 13) resistentes al antibiótico (5μl). Como se puede observar las clonas 7, 10, 11 y 13 son positivas para esta prueba. A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

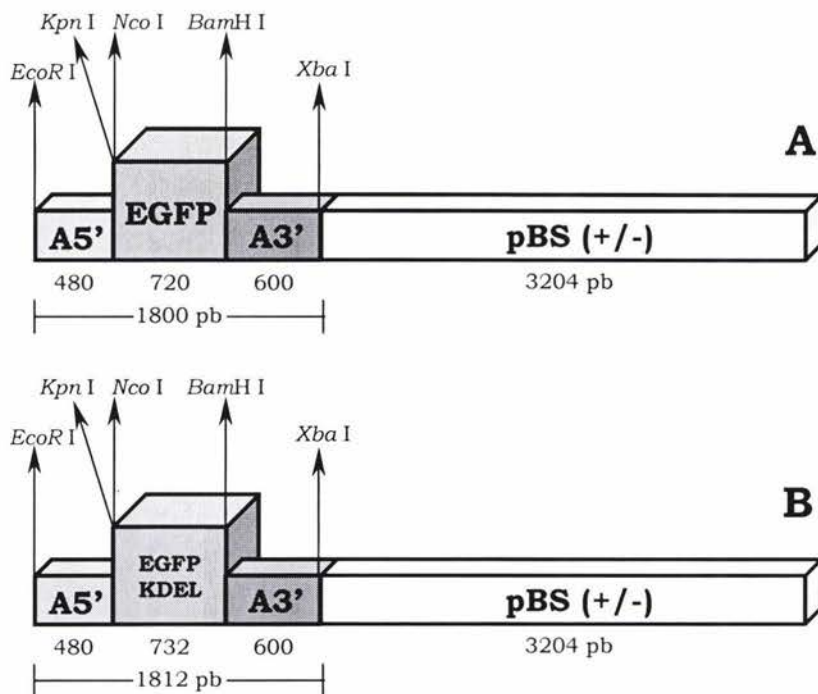


Figura 14

Figura 14. A) Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'EGFPA3' (clona 24) y B) pA5'EGFP-KDELA3' (clona 13), *EcoR* I, *Kpn* I, *Nco* I, *Bam*H I y *Xba* I
 La barra pequeña sin relleno corresponde al esqueleto del vector. Las barras con relleno pequeñas corresponden a las secuencias A5' (promotor de actina de *E. histolytica*) y A3' (secuencias para la poliadenilación de actina de *E. histolytica*). La barra grande con relleno corresponde a la secuencia que codifica a *EGFP* (A) o *EGFP-KDEL* (B). Los sitios únicos de restricción y los tamaños de cada fragmento están indicados arriba y abajo del esquema del vector respectivamente. Por facilidad de dibujo se esquematiza el plásmido lineal cortado con *EcoR* I.

En base a los resultados del PCR de colonia se seleccionó la clona 26 de pA5'EGFPA3' y la clona 13 de pA5'EGFP-KDELA3' para posteriores análisis y construcción de los siguientes plásmidos. El ADN de cada uno de los plásmidos anteriores se purificaron por el método de STET-PREP y se sometieron a análisis de restricción con *Nco* I + *EcoR* I, *Nco* I + *Bam*H I, *Nco* I + *Xba* I y *Nco* I + *Kpn* I. Se seleccionó la enzima *Nco* I ya que permite la diferenciación entre los plásmidos conteniendo la secuencia *EGFP* o *EGFP-KDEL* con respecto al que contiene la secuencia *Neo*. En el caso de la construcción con *EGFP* y *EGFP-KDEL* este sitio está contenido en el oligonucleótido SMC-1 SENSE utilizado para la amplificación de estas secuencias junto al sitio de corte *Kpn* I el cual se localiza en el extremo 3' de la secuencia del promotor de actina, mientras que *Nco* I en pA5'NeoA3' se encuentra a 562 pb del sitio de inicio de traducción de *Neo* (Figuras No. 7 y 14). Así que con la combinación de *Nco* I junto con otras enzimas de corte único permite un patrón de restricción diferencial entre los distintos plásmidos.

Los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13 en donde el ADN de pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' cortado con *Nco* I + *Bam*H I liberan los fragmentos de 720 pb correspondientes a la secuencia de *EGFP* (Figura 12, carril 2) y 732 pb para la secuencia de *EGFP*-KDEL (Figura 13, carril 2) así como una banda de 4204 pb correspondiente al fragmento pA5'__A3'. Cuando el ADN se cortó con *Nco* I + *Eco*R I se obtuvo un fragmento de aproximadamente 480 pb correspondiente al tamaño esperado del fragmento conteniendo el promotor de actina de *E. histolytica* (A5') y una banda de 4524 pb para p__EGFPA3' (Figura 12, carril 3) y de 4536 para p__EGFP-KDELA3' (Figura 13, carril 3). En el caso donde el ADN se cortó con *Nco* I + *Xba* I se obtuvieron una banda de 1320 pb para EGFPA3' y otra de 3684 pb para pA5' en el caso de pA5'EGFPA3' (Figura 12, carril 4), mientras que para pA5'EGFP-KDELA3' (Figura 13, carril 4) se obtuvieron una banda 1332 pb para EGFP-KDELA3' y otra de 3684 pb para pA5'. Finalmente cuando los ADNs se digirieron con *Nco* I + *Kpn* I ambos ADNs se linearizaron dando una banda de 5004 para pA5'EGFPA3' (Figura 12, carril 5) y de 5016 para pA5'EGFP-KDELA3' (Figura 13, carril 5).

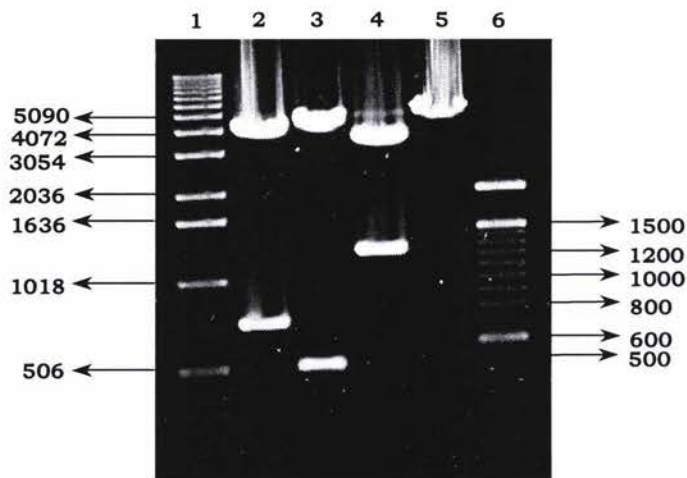


Figura 12

Figura 12. Análisis de restricción para pA5'EGFPA3' (clona 26)

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) C-26/*Nco* I + *Bam*H I (5µl), 3) C-26/*Nco* I + *Eco*R I (5µl), 4) C-26/*Nco* I + *Xba* I (5µl), 5) C-26/*Nco* I + *Kpn* I (5µl), 6) Marcadores de peso molecular de 100 pb (3µl). A la izquierda y derecha se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

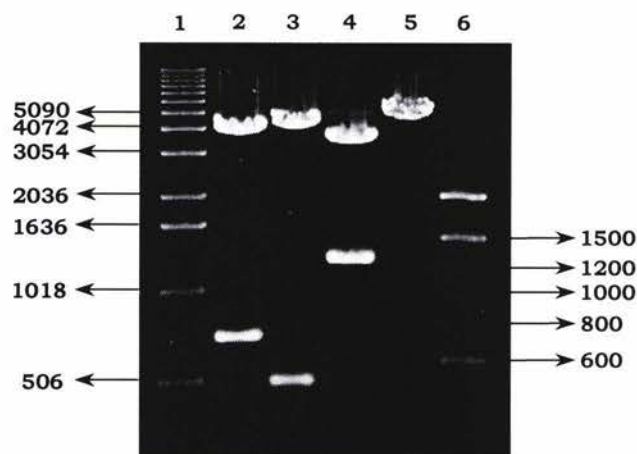


Figura 13

Figura 13. Análisis de restricción para pA5'EGFP-KDELA3' (clona 13)

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3 μ l), 2) C-13/*Nco* I + *Bam*H I (5 μ l), 3) C-13/*Nco* I + *Eco*R I (5 μ l), 4) C-13/*Nco* I + *Xba* I (5 μ l), 5) C-13/*Nco* I + *Kpn* I (5 μ l). 6) Marcadores de peso molecular de 100 pb (3 μ l). A la izquierda y derecha se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

12.2. Construcción de los vectores de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'

Ya verificado que se tenían los ADNs requeridos se hizo una extracción de ADN por lisis alcalina de cada uno de los vectores pA5'EGFPA3' (5004 pb), pA5'EGFP-KDELA3' (5016 pb) y pA5'NeoA3' (5076 pb). Posteriormente se digirieron con *Eco*R I y *Xba* I con la finalidad de liberar y purificar los fragmentos A5'EGFPA3', A5'EGFP-KDELA3' y A5'NeoA3' como se muestra en la Figura No. 15. Como se muestra se obtuvieron dos bandas en los tres casos, una de las cuales corresponde a un tamaño de 3204 correspondientes al vector pBS y otra de 1872 pb para A5'NeoA3' (carril 2), 1800 pb para A5'EGFPA3' (carril 3) y 1812 pb para A5'EGFP-KDELA3' (carril 4). Ya verificado que se obtuvo la digestión completa de los diferentes ADNs el total de la digestión se corrió en un gel preparativo y se purificaron los fragmentos de 1872, 1800 y 1812 con el kit de QIAGEN como se describe en materiales y métodos. En la Figura No. 16 se muestra el corrimiento de una alícuota de los fragmentos A5'EGFPA3', A5'EGFP-KDELA3' y A5'NeoA3' purificados, carriles 2,3 y 4 respectivamente.

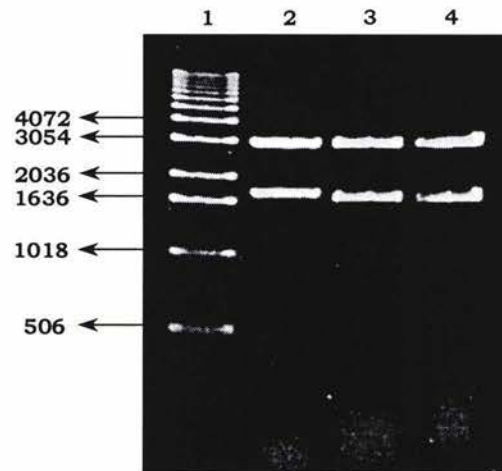


Figura 15

Figura 15. Digestion de pA5'NeoA3', pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' con *EcoR* I y *Xba* I

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) pA5'NeoA3' digerido con *EcoR* I y *Xba* I (0.5µl), 3) pA5'EGFPA3' digerido con *EcoR* I y *Xba* I (1µl), 4) pA5'EGFP-KDELA3' digerido con *EcoR* I y *Xba* I (1µl). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

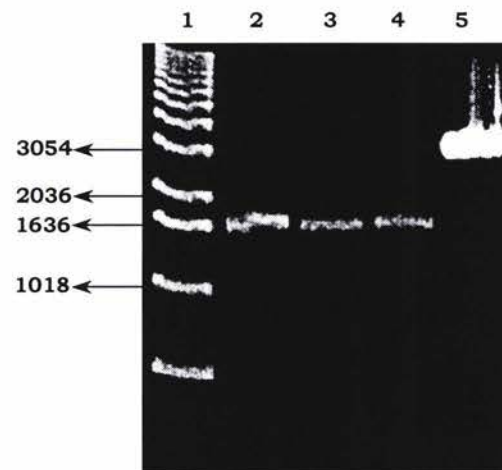


Figura 16

Figura 16. Fragmentos A5'NeoA3', A5'EGFPA3' y A5'EGFP-KDELA3' purificados

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) Fragmento A5'NeoA3' de 1872 pb (3µl), 3) Fragmento A5'EGFPA3' de 1800 pb (3µl), 4) Fragmento A5'EGFP-KDELA3' de 1812 pb (3µl), 5) pBS +/- digerido con *Xba* I (0.25µl, dil 1:25). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

De manera paralela se extrajo ADN de pBS (+/-) por la técnica de cloruro de cesio y se linearizó con la enzima *Xba* I resultando en una banda de 3204 pb (Figura No. 16, carril 4).

El plásmido pBS (+/-) digerido con *Xba* I se utilizó como vector para clonar los insertos *A5'EGFPA3'* digerido con *EcoR* I/*Xba* I + *A5'NeoA3'* digerido *EcoR* I/*Xba* I y *A5'EGFP-KDELA3'* digerido con *EcoR* I/*Xba* I + *A5'NeoA3'* digerido con *EcoR* I/*Xba* I. Las ligaciones se realizaron como se describe en materiales y métodos esperando que los fragmentos *A5'EGFPA3'* y *A5'NeoA3'* se unan entre ellos en su extremo *EcoR* I y con el vector en el extremo *Xba* I. De la misma manera se realizó la ligación con la construcción conteniendo la secuencia KDEL. De este modo se obtendrían los plásmidos resultantes esquematizados en la Figura No. 21. Después de transformar células competentes SURE (con una eficiencia de transformación de $1.06 \times 10^7/\mu\text{g}$ de ADN) con las ligaciones anteriores se plaquearon en cajas de LB + Ampicilina adicionado con 40 μl de X Gal 20 mg/ml y 4 μl de IPTG 20 mg/ml (1M). Se obtuvieron varias colonias resistentes al antibiótico de las cuales se seleccionaron 8 posibles colonias positivas (resistentes a ampicilina y de color blanco) de cada una de las dos construcciones y se plaquearon nuevamente por dilución para asegurar la obtención de colonias puras. Una vez que se obtuvieron colonias puras se les extrajo el ADN por el método de STET-PREP para su análisis posterior.

Para verificar que el ADN corresponde a p*A5'EGFPA3'-A5'NeoA3'* y a p*A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'* se sometieron a análisis de restricción usando las enzimas *Nco* I, *Xba* I para comprobar la presencia del inserto clonado y con *Sph* I y *Pst* I para determinar la orientación en que dichos insertos se clonaron en el vector ya que esta inserción no fue orientada.

De las 8 clonas analizadas de p*A5'EGFPA3'-A5'NeoA3'* 7 fueron positivas y 8 en el caso de p*A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'* mostrando el patrón de restricción esperado. De las 15 clonas positivas que resultaron de las dos construcciones se eligieron las clonas 2 y 4 para p*A5'EGFPA3'-A5'NeoA3'* y las clonas 6 y 7 para p*A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'* ya que cada una de estas representa clonas con las dos posibles orientaciones de clonación esperadas. Estos resultados se muestran en las Figuras 17 a 20.

Se seleccionó la enzima *Nco* I ya que esta tiene su sitio de corte en las dos secuencias clonadas *A5'EGFPA3'* o *A5'EGFP-KDELA3'* y *A5'NeoA3'* como se muestra en las figuras 5 y 14 permitiendo así el verificar que ambos insertos fueron ligados y clonados a su vez en el vector.

El resultado se muestra en la Figura 17 en donde el ADN de p*A5'EGFPA3'-A5'NeoA3'* (carriles 2 y 3) y p*A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'* (carriles 4 y 5) cortado con *Nco* I libera dos fragmentos uno que no varía en las dos construcciones de 1521 pb que corresponde a los dos fragmentos *A5'* unidos en su sitio *EcoR* I mas los primeros 561 pb de la secuencia de Neomicina, y otro de 5355 y 5367 correspondientes al vector mas ambas secuencias *A3'* y la secuencia de EGFP o EGFP-KDEL respectivamente y los últimos 231 pb de la secuencia de Neomicina (Figura 21).

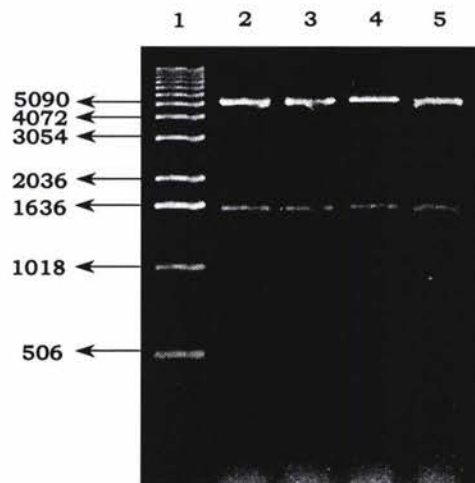


Figura 17

Figura 17. Análisis de restricción de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) C-2/*Nco* I (5µl), 3) C-4/*Nco* I (5µl), 4) C-6/*Nco* I (5µl), 5) C-7/*Nco* I (5µl). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

En el caso de la restricción con *Xba* I se usó para liberar el inserto completo (A5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3') del vector pBS. Como se muestra en la Figura No. 18 *Xba* I esta presente en los sitios de corte donde se clonaron los dos insertos ligados en su sitio *EcoR* I obteniéndose dos fragmentos, uno de 3672 pb para A5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (carriles 2 y 3) o de 3684 pb para A5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (carriles 4 y 5) y otro de 3204 pb correspondiente a el vector pBS +/- (carriles 2-5).

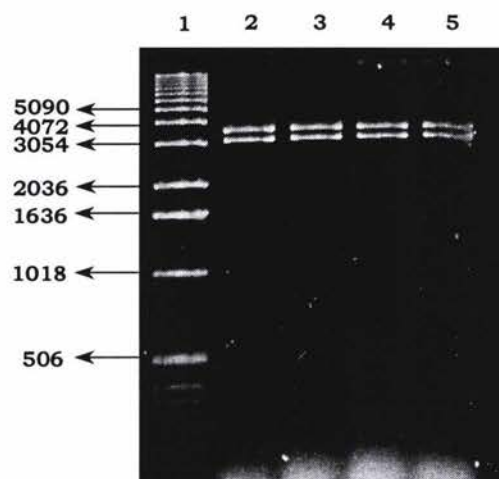


Figura 18

Figura 18. Análisis de restricción de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7). Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) C-2/*Xba* I (5µl), 3) C-4/*Xba* I (5µl), 4) C-6/*Xba* I (5µl), 5) C-7/*Xba* I (5µl). A la izquierda se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

Se utilizó la enzima *Sph* I para determinar la orientación de los insertos. Esta enzima no está presente en las secuencias *A5'EGFPA3'* y *A5'EGFP-KDELA3'*, pero sí en el fragmento *A5'NeoA3'* a 532 pb del sitio de inicio de la traducción de *Neo* y en el sitio múltiple de clonación entre los sitios de corte para *Xba* I y *Pst* I en el vector pBS (+/-). De tal manera que se generaran patrones de restricción diferentes para cada orientación del inserto clonado de cada plásmido. En un caso denominado arbitrariamente orientación Neo-pBS (Figura 21 A y C), la secuencia *A5'NeoA3'* está "junto" a las enzimas *Xba* I, *Sph* I y *Pst* I del vector pBS (+/-). En el segundo denominado arbitrariamente orientación EGFP-pBS (Figura 21 B y D), la secuencia *A5'NeoA3'* se encuentra separado, de las enzimas *Xba* I, *Sph* I y *Pst* I del vector pBS (+/-), por las secuencias de *A5'EGFPA3'* o *A5'EGFP-KDELA3'* (Figura No. 21).

Como se muestra en la Figura 19 el ADN de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (carril 2) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (carril 4) es cortado con *Sph* I liberando dos fragmentos uno que no varía en las dos construcciones de 884 pb el cual abarca los últimos 262 pb de la secuencia de Neomicina más la secuencia A3' y otros de 5992 pb para pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y 6004 pb para pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', correspondientes al vector pBS +/-, los primeros 530 pb de la secuencia de Neomicina ambas secuencias A5', y la secuencia de EGFPA3' o EGFP-KDELA3' respectivamente, correspondiendo a la orientación Neo-pBS (Figura No. 21 A y C). Por otro lado los carriles 2 y 5 muestran una orientación diferente con respecto a los carriles 2 y 4 de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', estos tienen un fragmento de 2832 pb y 2844 pb que abarcan los primeros 530 pb de la secuencia de Neomicina así como su fragmento A5', las secuencias A5'EGFPA3' o A5'EGFP-KDELA3' respectivamente y otro el fragmento que no varía de 4004 pb, que corresponden al vector pBS +/-, los últimos 262 pb de la secuencia de Neomicina y la secuencia A3', correspondiendo a la orientación EGFP-pBS (Figura 21 B y D).

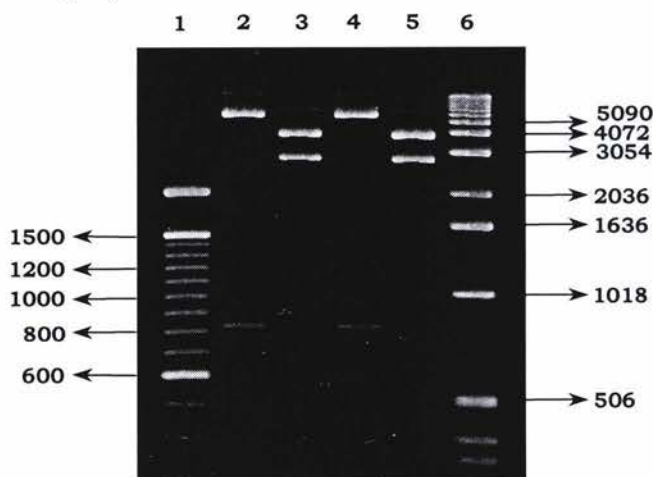


Figura 19

Figura 19. Determinación de la orientación del inserto de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7)

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En los carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) C-2 orientación Neo-pBS/*Sph* I (5µl), 3) C-4 orientación EGFP-pBS/*Sph* I (5µl), 4) C-6 orientación Neo-pBS

/Sph I (5µl), 5) C-7 orientación EGFP-pBS /Sph I (5µl). 6) Marcadores de peso molecular de 100 pb (3µl). A la izquierda y derecha se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

Para corroborar los resultados anteriores se realizó el mismo estudio con la enzima de restricción *Pst* I que presenta características similares a las de *Sph* I, que como se mencionó anteriormente, no se encuentra en las secuencias *A5'EGFPA3'* y *A5'EGFP-KDELA3'*, encontrándose un sitio *Pst* I junto a *Sph* I en el sitio múltiple de clonación. La diferencia es que *Pst* I está a 178 pb del sitio inicio de la secuencia de Neomicina y no a 532 pb como *Sph* I, por lo que obtendríamos un patrón de restricción diferente al anterior y que nos confirmaría tanto la orientación como la ubicación de diferentes sitios de restricción.

Por lo tanto como se muestra en la Figura 20 al momento de digerir con *Pst* I se generó un fragmento de 1230 pb el cual abarca los últimos 624 pb de la secuencia de Neomicina y la secuencia *A3'* y otros que son el resto del plasmido de 5646 pb (pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3', carril 2) y 5658 pb (pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', carril 4) los cuales abarcan los primeros 178 pb de la secuencia de Neomicina, ambas secuencias A5', las secuencias A3'EGFP o A3'EGFP-KDEL, que corresponde a la orientación Neo-pBS (Figura 21 A y C). En los carriles 3 y 5 de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' muestran una orientación diferente (orientación EGFP-pBS) a las antes mencionadas ya que al momento de digerir genera un fragmento de 2474 pb (pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3') y de 2486 pb (pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3') los cuales abarcan las secuencias A5'EGFPA3' o A5'EGFP-KDELA3', los primeros 178 pb de la secuencia de Neomicina así como su fragmento A5' y otro que no varía de 4402 pb, que son el resto del plasmido los cuales abarcan los últimos 624 pb de la secuencia de Neomicina así como su secuencia A3' y el vector pBS +/- (Figura 21 B y D).

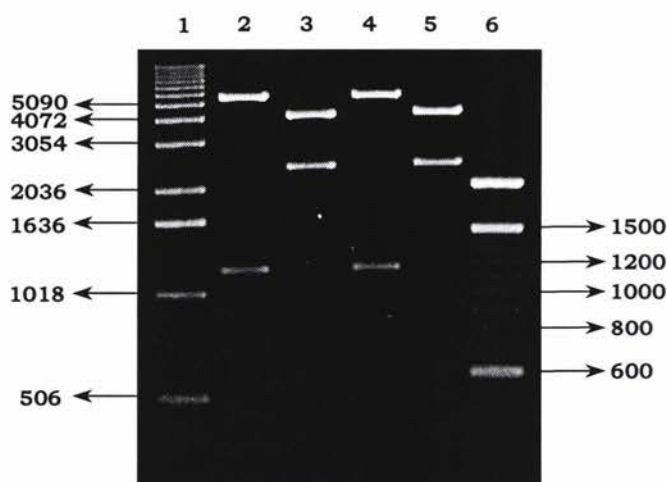


Figura 20

Figura 20. Determinación de la orientación del inserto de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7)

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular de 1 Kb (3µl), 2) C-2 orientación Neo-pBS / *Pst* I (5µl), 3) C-4

orientación EGFP-pBS / *Pst* I (5µl), 4) C-6 orientación Neo-pBS / *Pst* I (5µl), 5) C-7 orientación EGFP-pBS / *Pst* I (5µl). 6) Marcadores de peso molecular de 100 pb (3µl). A la izquierda y derecha se muestran los Pesos Moleculares de los Marcadores.

A diferencia del patrón de restricción de las dos primeras digestiones (*Nco* I y *Xba* I) en el cual no se observó ninguna diferencia entre las clonas de las dos construcciones Figuras 17 y 18. En las Figuras 19 y 20 se observó que las clonas 2 y 4 (carriles 1 y 2) para pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3', y las clonas 6 y 7 (carriles 3 y 4) para pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', tienen diferentes sitios de restricción para las enzimas *Sph* I y *Pst* I, por lo tanto obtuvimos clonas en ambas orientaciones. En el caso de la construcción pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3', la clona 2 tiene una orientación Neo-pBS (Figura 21 A) y la clona 4 tiene una orientación EGFP-pBS (Figura 21 B). Por otro lado en la construcción pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', la clona 6 tiene una orientación Neo-pBS (Figura 21 C) y la clona 7 tiene una orientación EGFP-pBS (Figura 21 D).

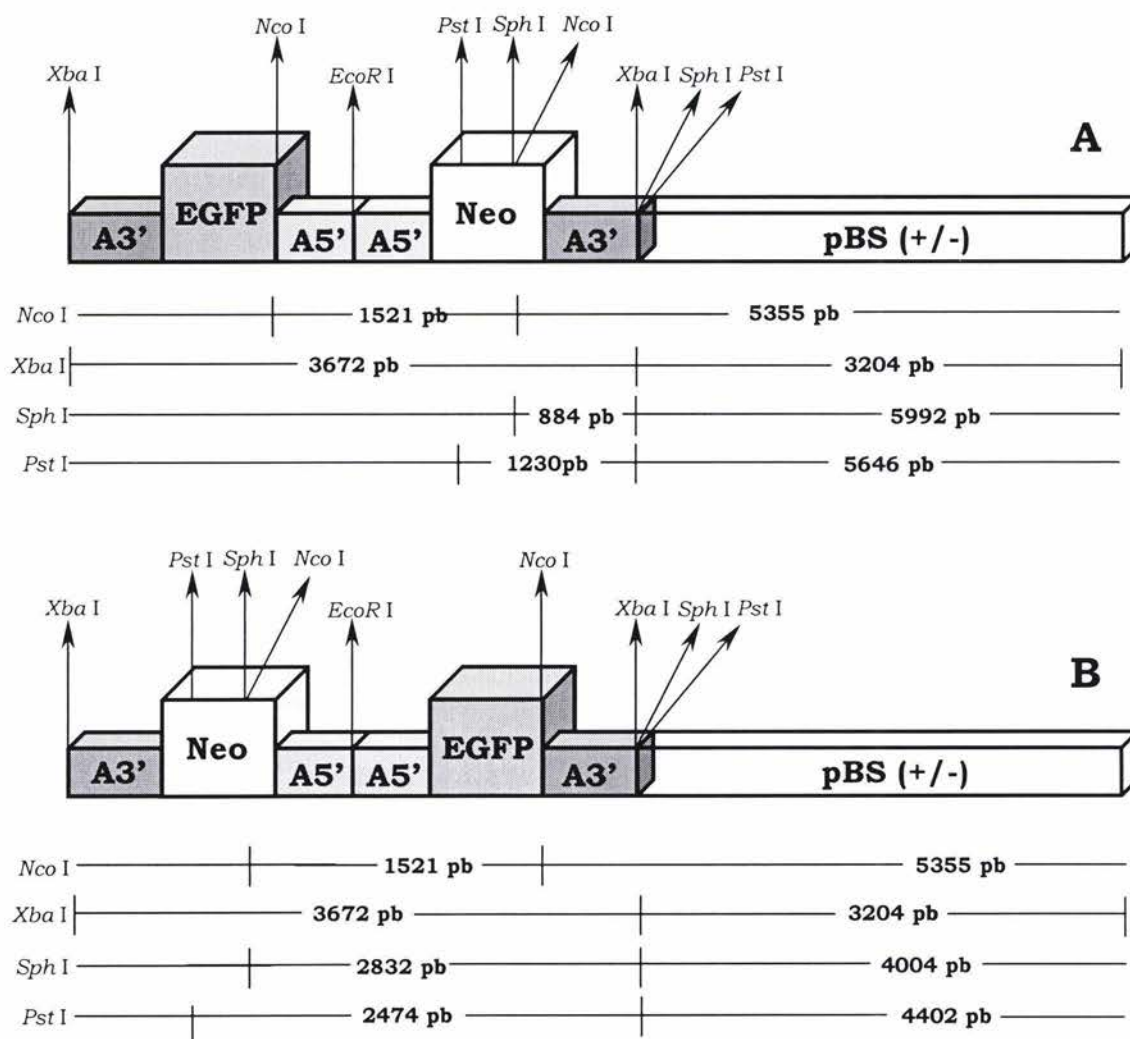


Figura 21.

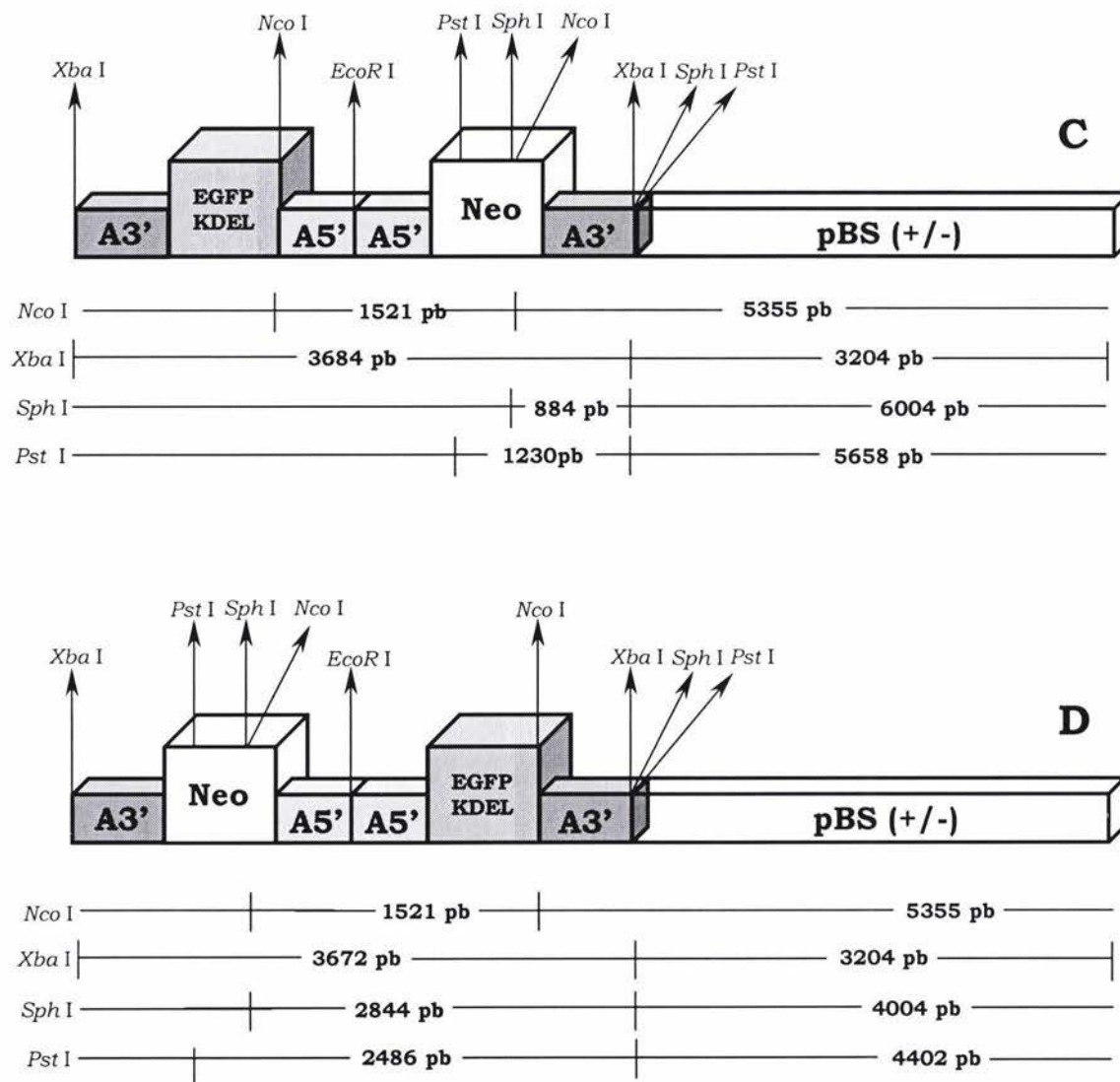


Figura 21. (Continuación) Mapa de restricción de sitios únicos de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (clonas 2 y 4) y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (clonas 6 y 7) (*Nco I*, *Xba I*, *Sph I* y *Pst I*)

A: C-2 orientación Neo-pBS. B: C-4 orientación EGFP-pBS. C: C-6 orientación Neo-pBS. D: C-7 orientación EGFP-pBS.

La barra pequeña sin relleno corresponde al esqueleto del vector. Las barras con relleno pequeñas corresponden a las secuencias A5' (promotor de actina de *E. histolytica*) y A3' (secuencias para la poliadenilación de actina de *E. histolytica*). La barra grande con relleno corresponde a la secuencia que codifica a EGFP (A y B) o EGFP-KDEL (C y D). La barra grande sin relleno corresponde a la secuencia que codifica a Neomicina. Los sitios únicos de restricción y los tamaños de cada fragmento están indicados arriba y abajo del esquema del vector respectivamente. Por facilidad de dibujo se esquematiza el plásmido lineal representado el plásmido circular.

Ya verificado que se tenían los ADNs requeridos se hizo una extracción de ADN por CsCl/Bromuro de Etidio de las clonas 2 y 4 de pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' (6876 pb), y las clonas 6 y 7 de pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' (6888 pb) y se determinó su concentración por D.O.₂₆₀ y su pureza por el radio de D.O._{260/280}.

Los resultados obtenidos se enlistan a continuación:

pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' clona No. 2 D.O.= 0.0403	Concentración ADN= 2.01 µg/ml
	Pureza ADN= 2.48
pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' clona No. 4 D.O.= 0.0315	Concentración ADN= 1.57 µg/ml
	Pureza ADN= 3.0
pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' clona No.10 D.O.= 0.0383	Concentración ADN= 1.91 µg/ml
	Pureza ADN= 2.9
pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' clona No.11 D.O.= 0.0388	Concentración ADN= 1.69 µg/ml
	Pureza ADN= 2.7

12.3. Transfección de Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* con pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'

Para evaluar la expresión y localización de la EGFP y la EGFP-KDEL se transfectaron trofozoítos de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS.

Utilizando el método de fosfato de calcio, 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* se transfectaron con 40 µg de ADN de las clonas 2 o 4 de la construcción pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y 6 o 7 de la construcción pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'. Como control negativo se transfectaron las amibas de la misma cepa en las mismas condiciones pero sin ADN. Después de 32 hrs. post-transfección, se les agregó el antibiótico de selección G418 (5 µg/ml), se dejaron 24 hrs. bajo la selección y se evaluó la expresión de EGFP y EGFP-KDEL bajo el microscopio de fluorescencia.

En la Figura No. 22 A, se muestra las amibas control en el cual no se observa fluorescencia.

En la Figura No. 22 B se muestra una amiba transfectada con el vector pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3', en donde se observa la fluorescencia en todo el citoplasma.

En la Figura No. 22 C y D se muestra las amibas transfectadas con el vector pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3', en donde la proteína verde fluorescente se localiza en una o varias vesículas de tamaño grande.

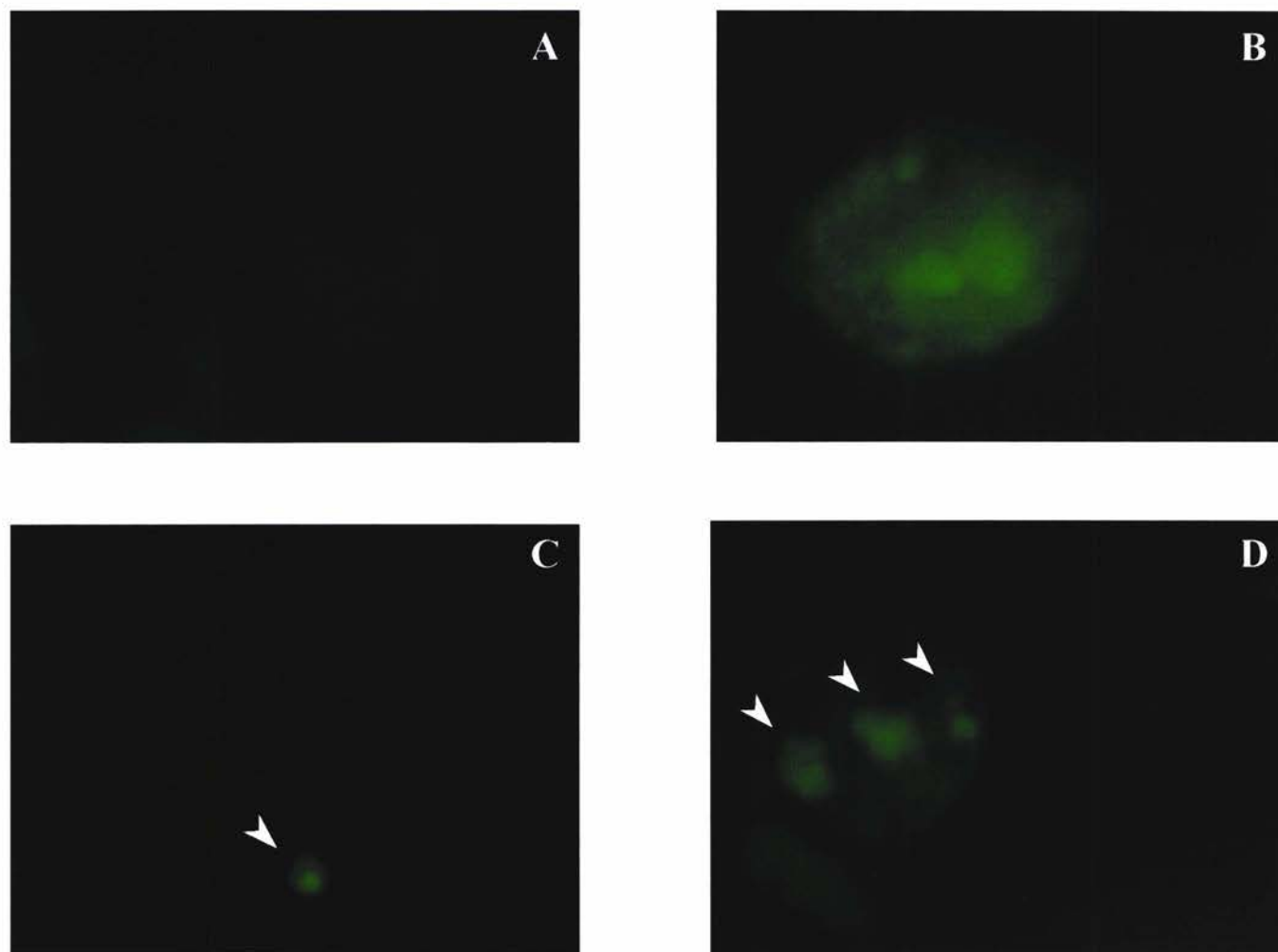


Figura 22. Análisis de fluorescencia de Trofozoítos de *E. histolytica* transfectados

A: Control negativo (trofozoítos transfectados sin ADN). B: Trofozoítos transfectados con pA5'EGFP-A3'-A5'NeoA3'. C y D: Trofozoítos transfectados pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3'. Vesículas verdes fluorescentes están indicadas con flechas.

La amibas transfectadas se continuaron creciendo en presencia del antibiótico (G418), pero después de pases subsiguientes se murieron. Este experimento se repitió en varias ocasiones teniendo en todos ellos el mismo resultado.

También fueron probadas diferentes condiciones de electroporación en las que no logramos obtener transfectantes estables. En estos casos después de 96 hrs post-transfección las amibas murieron.

9

DISCUSIÓN

Entamoeba histolytica es un parásito que tiene una organización subcelular peculiar. Se ha observado que aunque la activación secretoria que presenta, esta bien definida y que aparentemente es necesaria para sus propiedades líticas e invasivas, los organelos típicos involucrados en la ruta secretoria de células eucariotas, tales como el Retículo Endoplásmico (RE) y complejo de Golgi (CG), no se organizan mostrando estructuras característica en eucariontes superiores.

En este trabajo se propuso generar un sistema reportero para la evaluación *in vivo* del tráfico vesicular llevado a cabo por *E. histolytica* basado en el empleo, de la proteína verde fluorescente (EGFP) y la proteína verde fluorescente fusionada a una secuencia C-terminal KDEL, necesaria para la retención de proteínas residentes del Retículo Endoplásmico (EGFP-KDEL). Para ello se construyeron dos plásmidos de transfección a los cuales se les adicionó un gen EGFP o EGFP-KDEL además de un gen que codifica para un antibiótico de selección de células eucariotas (*Neo*). Estas secuencias se encuentran bajo el control del promotor en la región flanqueante 5' y de las secuencias necesarias para poliadenilación en la región flanqueante 3', provenientes de actina de *E. histolytica*.

Diversos vectores se han utilizado para la transfección de este parásito. Algunos de ellos han resultado eficientes para obtener una transfección transitoria (Gilchrist y col., 1995; BuB y col., 1995; Nickel y Tannich, 1994; Purdy y col., 1994) y otros para obtener una transfección estable episomal de trofozoítos de *E. histolytica* (Arhets y col., 1998; Ankri y col., 1998; Bracha y col., 1999; Hamann y col., 1995; Moshitch-Moshkovitch y col. 1996 y 1998; Purdy y col., 1996; Rinat col., 1997; Vines y col., 1995). El promotor de actina fue caracterizado utilizando como gen reportero el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (Nickel y Tannich, 1994), posteriormente este promotor se utilizó para la expresión de la secuencia que codifica para Neomicina permitiendo así la permanencia episomal del vector de transfección y dando lugar a la transfección estable episomal (Hamann y col., 1995). También el análisis de un promotor de lectina se realizó utilizando la transfección transitoria del gen reportero de la cloranfenicol acetiltransferasa (BuB y col., 1995; Purdy y col., 1994), promotor que también mostró ser eficiente para sostener una transfección estable episomal (Vines y col., 1995; Purdy y col., 1996.). Finalmente otro promotor que ha sido usado con éxito en transfecciones estables es un promotor de ribosomal (Ankri y col., 1998; Bracha y col., 1999 y 2000; Moshitch-Moshkovitch y col., 1996). De estos tres promotores hasta la fecha usados, el promotor de lectina muestra ser el más débil, mientras que el de actina y ribosomal son promotores fuertes que incluso han sido útiles para la expresión de secuencias antisentido capaces de inhibir la expresión de genes como el ameboporo, la lisina de 30 kDa, miosina II, cistein proteinasas, etc. (Ankri y col., 1998; Rinat y col., 1997; Bracha y col., 1999 y 2000; Arhets y col., 1998).

Ya que nosotros requerimos de altos niveles de expresión basándonos en estos antecedentes, elegimos el promotor y las secuencias necesarias para la poliadenilación de actina de *E. histolytica*, para la construcción de nuestros vectores de transfección,

dirigiendo la síntesis tanto del gen de resistencia (*Neo*) como de la proteína verde fluorescente y su quimera conteniendo la secuencia KDEL (*EGFP* y *EGFP-KDEL*).

Para la localización de un posible Retículo Endoplásmico en amiba, construimos un vector de transfección (pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3') el cual tiene una secuencia tetrapeptídica KDEL carboxi-terminal. Esta secuencia cuando esta presente en una proteína, resulta en su retención en el Retículo Endoplásmico. La secuencia KDEL/HDEL reconoce el receptor ERD2 o receptor de KDEL/HDEL, una proteína unida a membrana del *cis*-Golgi. Este receptor fue identificado por primera vez en levaduras (Semeanza, 1990) y subsecuentemente identificado en una amplia variedad de organismos. Sánchez-López y col. en 1998 aislaron y caracterizaron las secuencias que codifican para un gen homólogo de ERD2 en *E. histolytica*. En células eucariontas este receptor esta localizado en el compartimiento *cis*-Golgi reciclando proteínas al retículo endoplásmico de manera constante. La presencia del ERD2 así como diversos genes que codifican para proteínas residentes del RE y AG al igual que marcadores involucrados en el tráfico vesicular de eucariontes superiores tales como el ER-SRP54, la subunidad alfa Sec61, la proteína disulfuro isomerasa (PDI), el STT3 (Sánchez-Lopez y col. 2000), la chaperonina BiP (Field y Samuelson Observaciones no publicadas), ARF (Gosh y col., 1999) y diversas proteínas Rab como: EhRab7, EhRab11 (Tanaka y col., 1997; Tamesvari y col. 1999), EhRab5 (Saiko-Nakano y col., 2000), EhRab8 (Juárez y col., 2001) y EhRabB (Rodríguez y col., 2000) han sido clonados en *E. histolytica*. Estos estudios moleculares han dado evidencia de funciones altamente especializadas en amiba, lo cual apoya un mecanismo de tráfico vesicular especializado lo que involucraría la función de organelos equivalentes al Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi.

Por el contrario los estudios ultraestructurales hasta la fecha realizados han sugerido la ausencia de compartimientos membranosos altamente organizados como un Aparato Golgi y Retículo Endoplásmico característico en células eucariontes superiores (Chávez-Munguía y col., 2000; Mazzuco y col., 1997; Gosh y col., 1999). Por otro lado estudios de microscopia de fluorescencia han revelado la presencia de vesículas de diferente tamaño y localización que se ha sugerido corresponde a un posible RE y AG primitivo (Gosh y col., 1999). Siendo aun pocas las evidencias que apoyen esta posibilidad queda clara la necesidad de establecer estrategias y herramientas que permitan dilucidar los mecanismos que utiliza la amiba para realizar el transporte vesicular tan intenso que presenta.

La proteína verde fluorescente ha llegado a ser una de las herramientas más utilizadas como marcador molecular para localización de organelos y tráfico de proteínas, etc. en estudios *in vivo*, en biología molecular y celular. Su habilidad para generar una emisión eficiente y altamente visible de su fluoróforo interno es muy valorable. La clonación molecular de la *GFP* y la demostración por Chalfie y col., (1994) de que la *GFP* puede ser expresada como un transgen funcional, ha abierto nuevas vías de investigación en la biología celular. La fluorescencia de la *GFP* ha sido expresada en una variedad de organismos como bacterias, mixomicetos, plantas y mamíferos (Gerdes y col., 1999). En este trabajo se utilizó la *EGFP* que es una mutante de la *GFP* silvestre, la cual esta modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507). El plásmido pEGFP codifica la variante *GFPmut1* que contiene una substitución de doble aminoácido de Phe-

64 a Leu y Ser-65 a Thr, además la secuencia que codifica a la *EGFP* contiene mas de 190 cambios de base silenciosos que corresponden al uso de codones de humano (Clontech, pagina web). La secuencia flanqueante 5' ha sido convertida al sitio de inicio de la traducción de Kozak para aumentar la eficiencia de traducción en células eucarióticas. Estas características han colocado a la proteínas fluorescentes como una herramienta muy poderosa en el estudio de la localización de organelos y en el estudios de mecanismos dinámicos como el transporte vesicular y organización y dinámica del citoesqueleto (Tsien, 1998).

Como se dijo anteriormente en este trabajo se pretende obtener herramientas moleculares que nos permitan posteriormente estudiar los mecanismos de trafico vesicular en amiba. Para ello tanto la *EGFP* como la quimera *EGFP*-KDEL se clonaron en los vectores pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFPA-KDEL3'-A5'NeoA3' y se transfectaron en trofozoítos de *E. histolytica*, mostrando una fluorescencia en el citoplasma de la célula en el primer caso y en vesículas en el segundo. Esta fluorescencia fue fácilmente distinguible de parásitos control en donde no se observó fluorescencia (Figura 22). Ya que la auto-fluorescencia, tanto de la célula en estudio o del medio de cultivo en el que se encuentra, ha sido una limitante en algunos sistemas, nosotros evaluamos como un primer paso este parámetro (Tsien Y., 1998). Efectivamente encontramos que el medio de cultivo TY1-S-33 presenta un alta auto-fluorescencia que no permitía distinguir la fluorescencia producto de la transfección. Del mismo modo con este experimento descartamos que las amibas presenten una auto-fluorescencia alta. Por lo anterior antes de observar al microscopio de fluorescencia, las amibas transfectadas con los vectores mencionados anteriormente así como el control negativo, se lavaron con PBS como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en resultados se obtuvo una transfección transitoria exitosa a las 56 hrs. post-transfección (32 horas después de agregar el G418), tiempo en que se observó la fluorescencia en el citoplasma de la amiba cuando se uso pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y en vesículas cuando se uso pA5'EGFPA-KDEL3'-A5'NeoA3' (Figura 22). A pesar de que las amibas transfectadas con ambos vectores ya habían resistido y mostrado la expresión de la fluorescencia a las 32 hrs. de selección con el antibiótico, tiempo en que las amibas control ya habían muerto; éstas fueron incapaces de continuar creciendo en presencia del antibiotico, siendo al parecer condiciones letales para las amibas transfectadas con ambos vectores. Nosotros pensamos que nuestras condiciones de cultivo no son las idóneas quedándonos aún la duda si ésta muerte se debe a la pérdida o falla en la expresión del plásmido de transfección que confiere la resistencia a Neomicina o a un sobre-crecimiento de los cultivos. Estas posibilidades aun quedan por ser comprobadas.

La señal de la *EGFP* y *EGFP*-KDEL es clara, sin embargo no mostró ser muy intensa. De acuerdo a lo reportado en la literatura una vez que se logra obtener la trasfección estable episomal es posible el aumentar la concentración del antibiótico de selección aumentando así el número de copias del plásmido y a su vez de la expresión del gen a analizar (Hamann y col., 1995; Ortiz y col., 2000). En nuestro caso esta sería una posibilidad para incrementar la fluorescencia obtenida y facilitar de este modo los estudios *in vivo* posteriores en futuros proyectos. La exitosa transfección transitoria obtenida en este trabajo de la *EGFP* y *EGFP*-KDEL sienta las bases para futuros proyectos en los que se logre no solo la transfección estable episomal de estas proteínas fluorescentes si no también

su utilización en el entendimiento de los mecanismos de tráfico vesicular de éste parásito. Sin embargo, la fluorescencia obtenida fue lo suficientemente intensa para permitir observar que la *EGFP* se localizó en citoplasma como era esperado, mientras que cuando es fusionada a una secuencia KDEL, la fluorescencia se encontró en vesículas variables en número y tamaño. Estas observaciones son similares a las obtenidas por Gosh y col. (1999) quienes utilizando la secuencia KDEL fusionada a quitinasa en su C-terminal en trofozoítos de *E. histolytica*, revelaron su presencia utilizando anticuerpos antiquitinasa. Este grupo reportó un posible RE compuesto de vesículas de diferentes tamaños coincidiendo estos resultados con nuestros hallazgos.

Se ha reportado (Chávez-Munguía y col., 2000) que el uso de paraformaldehído para la fijación y análisis de muestras, no es muy apropiado para preservar la morfología de la célula, además de que la resolución del microscopio confocal es mucho menor comparada con la electrónica de transmisión no permitiendo una clara visualización de estas estructuras utilizando los métodos anteriores. Utilizando microscopía electrónica de transmisión se han reportado estructuras como vesículas alargadas que se piensa podrían corresponder a un RE y unas estructuras tubulares alargadas formando empalizadas que sugieren podrían corresponder a un AG, siendo aún necesario para demostrar fehacientemente esto, el utilizar marcadores moleculares que permitan la demostración de esta hipótesis (Chávez-Munguía y col., 2000).

Cada sistema presenta ventajas y desventajas mostrando que no se descartan entre ellos si no son complementarios, aportando cada uno evidencias que a la larga permitirán entender los mecanismos celulares y proponer modelos. Así nuestro sistema permitiría el análisis *in vivo* del fenómeno de tráfico vesicular permitiendo no solo verter evidencias de la morfología y localización de los organelos involucrados, si no también de su dinamismo ante diferentes estímulos externos. Estos estudios se pueden realizar sin afectar la fisiología general de la célula ya que la proteína verde fluorescente tiene gran flexibilidad como marcador no invasivo. Además, presenta la ventaja de que no se requieren de cofactores ni adición de substratos para su detección (Mitra y col., 1996). Por ello el uso de esta herramienta en el desarrollo de este trabajo es de gran utilidad ya que se pretende establecer las herramientas que en proyectos futuros aporte evidencias que junto con otras permita el dilucidar los mecanismos del transporte vesicular de este parásito.

14

CONCLUSIONES

- ☐ Se obtuvieron los plásmidos de transfección pA5'EGFPA3' y pA5'EGFP-KDELA3' como se demostró tanto por su patrón de restricción como por la amplificación de la secuencia *EGFP* y *EGFP-KDEL* por PCR.
- ☐ Se obtuvieron los plásmidos de transfección pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3' y pA5'EGFP-KDELA3'-A5'NeoA3' demostrándose, por su patrón de restricción. En ambas construcciones se obtuvieron las dos posibles diferentes orientaciones lo cual fue demostrado por análisis de restricción.
- ☐ Se obtuvo una transfección transitoria exitosa en la que se logró la expresión de la proteína *EGFP* y *EGFP-KDEL* bajo la dirección del promotor y secuencias de poliadenilación del gen de actina de *Entamoeba histolytica*.
- ☐ La proteína *EGFP* se localizó en el citoplasma de la célula transfectada cuando se usó el plásmido pA5'EGFPA3'-A5'NeoA3, después de 56 hrs. post-transfección.
- ☐ Cuando se fusionó la secuencia KDEL en el C-terminal de la proteína *EGFP* la fluorescencia se localizó en vesículas después de 56 hrs. post-transfección. Estas estructuras se sugiere que podrían corresponder a un posible Retículo Endoplásmico en amiba.

15

APÉNDICE

**Medios**

LB/lit: 10 gr de bacto triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de NaCl. Ajustar pH 7.5.

LB/Agar/lit: 25 gr de LB, 12.5 gr de agar.

LB/ampicilina: después de autoclavear enfriar a 50 °C y agregar 100 µg/ml de ampicilina).

TYI-S-33/6lit: 219 gr de peptona bitriptasa, 73.2 gr de dextrosa, 14.64 gr de NaCl, 4.44 gr de KH₂PO₄, 7.44 gr de L-cisteína, 1.44 gr de ácido ascórbico, 0.18 gr de citrato férrico de amonio. Se ajustó el pH a 6.8 y se esterilizó en autoclave 15 min. a 110 °C y se mantuvo almacenado hasta su uso a -20 °C. Justo antes de su uso el medio se suplementó con suero bovino (previamente descomplementado por calor a 65 °C/30 min.) a una concentración final de 13%, con mezcla de vitaminas de Diamond (*in vitro*, México) a una concentración final del 3% y finalmente con bencilpenicilina (0.25U.I/ml). Una vez que los trofozoítos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se incubaron en hielo durante 10 min. para despegar a las células de las paredes del tubo, el inóculo deseado se sembró en tubos con 10 ml de TYI-S33 más 2 ml de la mezcla suero-vitaminas-antibióticos.

TYM: 2% Bacto-tryptona, 0.5% extracto de levadura, 0.1 M NaCl, 10 mM de MgSO₄.

Antibióticos

IZT.

Ampicilina, solución stock: 500 mg/ml en H₂O; solución de trabajo: 100 µg/ml.

Geneticina (G418), solución stock: 100 mg/ml en Hepes 10 mM pH 7.2; solución de trabajo: 5 µg/ml.

Soluciones y Buffers

Buffer de muestra: azul de bromofenol 0.25%, cianol FF gileno 0.25%, glicerol en agua 30%. Almacenar a 4°C.

Buffer TFBI: 30 mM KOAc (pH 7), 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol. Esterilizar por filtración (no autoclavear).

Buffer TFBII: 10 mM MOPS (pH 7), 75 mM CaCl₂, 10 mM de KCL, 15% glicerol. Esterilizar por filtración (no autoclavear).

Buffer TE 0.1X p H8: Tris- HCl 1 mM pH 8/EDTA 0.1 mM pH 8.

HBS 2X: NaCl 280 mM/KCl 10 mM/Na₂HPO₄.2H₂O 1.5 mM/dextrosa 12 mM/HEPES 50 mM. Ajustar pH 7.05.

CaCl₂ 2 M: 10.8 g de CaCl₂.6H₂O/20 ml de agua.

Solución I: Glucosa 50 mM/ Tris.Cl 25 mM (pH 8)/ EDTA 10 mM (pH 8). Autoclavear y guardar a 4°C.

Solución II: NaOH 0.2 N / SDS1% (preparada en el momento a partir de un stock 10 N y 10% respectivamente).

Solución III: Acetato de potasio 5 M Acido acético glacial 11.5 ml H₂O 28.5 ml. La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

STET: Sucrosa al 8% / tritón X- 100 5%/ EDTA 50 mM pH 8 (3.7 g)/ tris- HCL p H8.

dNTPs: Se preparan a un concentración 1.25 mM en TE.

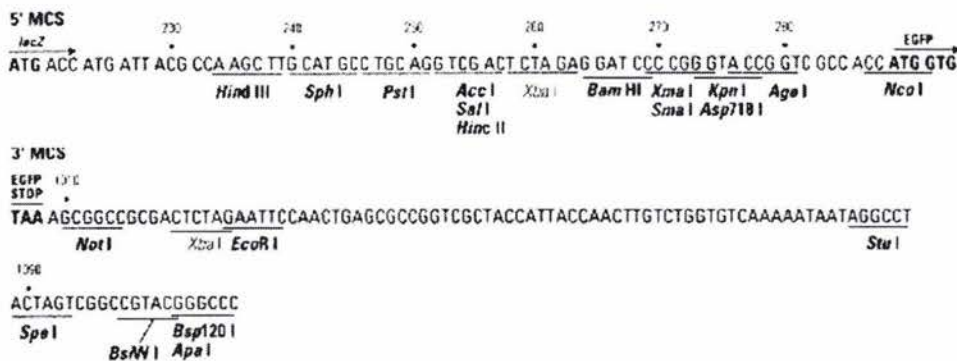
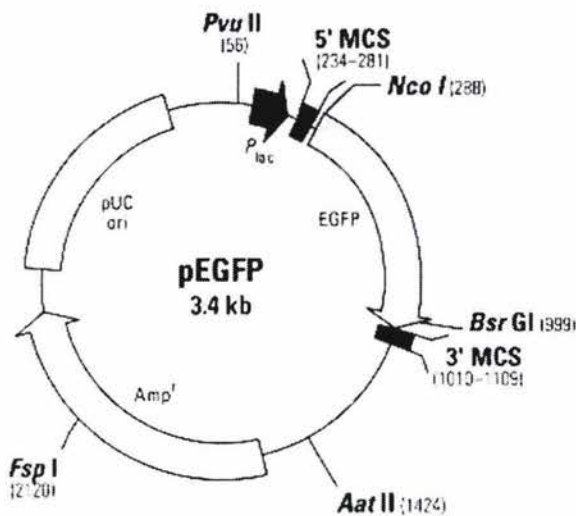
Buffer ELT (EDTA, Lizosima y Tritón): EDTA 100 mM, lizosima 2 mg/ml, Tritón X-100 0.1%. Preparar fresca con solución stock.

Buffer TS (Tris-Sacarosa): Tris-HCl 50 mM pH 7.5, sacarosa 25%. Almacenar a -20 °C.

PEG-NaCl (Polietilenglicol-cloruro de sodio): PEG 6000 al 20%, NaCl 1 M, adicionar 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 1 ml de EDTA 0.5 M.

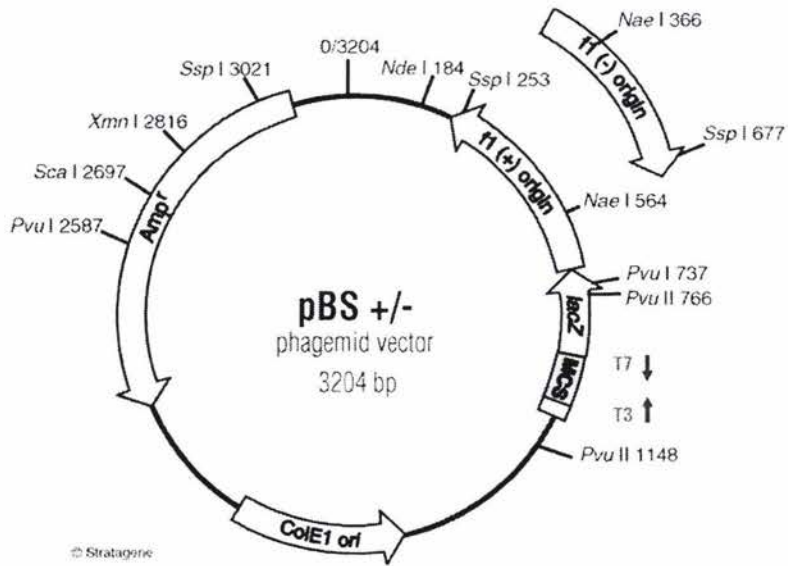
Solución de Isopropanol saturada con NaCl: Se hace una solución sobresaturada de NaCl. Se mezcla un volumen de isopropanol con dos volúmenes de solución sobresaturada.

Mapa de restricción y MCS de pEGFP http://www.clontech.com/techinfo/vectors_dis
Catalog #6077-1



Mapa de restricción de pBS+/-

http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm#pbluescript_ii_ks_plus



16

REFERENCIAS

- Aragual, A. V., Pandey, S., Kumar y Sagar, P. 1989. Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NHI-200 and properties of the extracellular enzyme. *J. Protozol.* **36**: 90-92.
- Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. 1996. *Molecular Biology of The Cell*. 3^a edición.
- Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. 1998. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol.* **28**(4): 777-85.
- Arhets P, Olivo JC, Gounon P, Sansonetti P, Guillen N. 1998. Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell.* **9**(6): 1537-47.
- Ausubel, Brent, Kingston. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology* 4^a edición.
- Bailey, G. B., Leitch, G.J. y Day; D.B. 1985. Chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **32**: 341-346.
- Barkker-Grunwald, T. y Wostman, C. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eucaryotic cell. *Parasitol Today.* **9**: 27-31.
- Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. 1999. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **34**(3): 463-72.
- Bracha R, Nuchamowitz Y, Mirelman D. 2000. Inhibition of gene expression in *Entamoeba* by the transcription of antisense RNA: effect of 5' and 3' regulatory elements. *Mol Biochem Parasitol.* **107**(1): 81-90.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M. y Tannich, E. 1996. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* **22**: 255-263.
- BuB H, Lioutas C, Dobinsky S, Nickel R, Tannich E. 1995. Analysis of the 170-kDa lectin gene promoter of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **72**(1-2): 1-10.
- Catalogo de Stratagene, 2002
- Catalogo de Life Technologies, 2001
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**: 802-5.
- Clark, C.G. 1999. The effect of secondary loss on our views of eukaryotic evolution. *Biol. Bull.* **196**: 385-388.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. and Ward, W.W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry.* **32**: 1212-8.
- Cubitt, A., Heim, R., Adams, S., Boyd, A., Gross, L. and Tsien, R., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS.* **20**: 448-55.
- Chavez-Munguia B, Espinosa-Cantellano M, Castanon G, Martinez-Palomo A. 2000. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res.* **31**(4 Suppl): S165-7.

- Diamond L.S., Harlow D.R., Cunnick C.C. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 431-2.
- Dopf, J. and Horiagan, T., 1996. Deletion mapping of the *Aequoria victoria* green fluorescent protein. *Gene.* **173**: 39-44.
- Gerdes H.H., Tvarusko W., Bentele M., Misteli T., Rudolf R., Kaether C., Spector D.L. and Eils R. 1999. Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(14): 7950-5.
- Ghosh, S.K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. and Samuelson, J. 1999. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba histolytica*; localization of secretory vesicles endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Infect. Immun.* **67** (6): 3073-3081.
- Gilchrist, C.A., Streets, H.L., Ackers, J.P. and Hall, R. 1995. Transient expression of luciferase in *Entamoeba histolytica* driven by the ferredoxin 5' and 3' regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **71**: 265-267.
- Hamann L., Nickel R. and Tannich E. 1995. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(19): 8975-9.
- Hasegawa, M., Hashimoto, T., Adachi, J., Iwabe N., Miyata, T. 1993. Early branchings in the evolutions of eukariotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lack mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* **36**: 380-388.
- Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y., 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **91**: 12501-4.
- Jackson, T.F. y Ravdin, J.I. 1996. Differentiation of *Entamoeba histolytica* an *Entamoeba dispar* infection. *Parasitol Today.* **12**: 406-409.
- Juarez P., Sanchez-Lopez R., Stock R.P., Olvera A., Ramos M.A. and Alagón A. 2001. Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **116**(2): 223-8.
- Leippe, M. 1997. Amoebapores. *Parasitol. Today* **13**: 178-183.
- Leippe, M., Sievertsen, H. J., Tannich, E. y Hortsman., D. 1995. Spontaneous release of cysteine proteinase but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* **111**: 569-574.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R. and Samuelson, J. 1999. Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell Biol.* **19**: 2198-2205.
- Mann, B., Torian, B.E., Vedvick T.S. y Petri A. W. 1991. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**: 3248-3252.
- Martínez Palomo. Capítulos-2-4. 7:Amibiasis. Editorial Médica Panamericana. (1989). Barcelona (España): 17-179.
- Mazzuco A., Benchimol M., De Souza W. 1997. Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron.* **28**: 241-7.
- McCoy, J.J., Mann, B.J., Vedvick T.S. y Petri A. W. 1993. Sequence analysis of genes encoding the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 325-328.

- McKerrow J. H., Sun E., Rosenthal P. J., Bouvier J. 1993. The proteasas and pathogenicity of parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 821-53.
- Meza I. 2000 . Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. *Parasitol Today* **16**: 23-28.
- Meza, I. 1992. *Entamoeba histolytica*: philogenetic considerations. A review. *Arch. Med. Res.* **23**: 1-5.
- Mitra, R., Silva, C. and Youvan, D., 1996. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene.* **173**: 13-7.
- Montero, M., Alvarez, J., Scheenen, W. J. and Pozzan, T. 1997. Ca²⁺ homeostasis the endoplasmic reticulum: coexistence of high and low [Ca²⁺] subcompartments in intact HeLa cells, *J Cell Biol.* **139**: 601-611.
- Morin, J. and Hastings, J., 1971. Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell Physiol.* **77**: 313-8.
- Morise H., Shimomura O., Johnson F.H., Winant J., 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminecent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**: 2656-2662.
- Moshitch-Moshkovitch S., Petter R., Levitan A., Stolarsky T. and Mirelman D. 1998. Regulation of expression of ribosomal protein L-21 genes of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* is at the post-transcriptional level. *Mol Microbiol.* **27**(4): 677-85.
- Moshitch-Moshkovitch, T., Stolarsky, D., Mirelman and N.R. Alon, 1996. Stable transfection and gene expression in *E. dispar*. *Mol Biochem Parasitol* **83**: 257-261.
- Muñoz, ML Moreno, M.A., Pérez-García, J.N., Tovar G.N. and Hernández, V.I. 1991. Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules. *Mol Microbiol* **5**: 1707-1714.
- Nickel R, Tannich E. 1994. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **91**(15): 7095-8.
- Olkkonen, V. M. y Stenmark, H. 1997. Role of Rab GTPases in membrane traffic. In: A survey of Cell Biology. K. W. Jeon (ed). USA. *Academic Press Int. Rev. Cytol.* **176**: 1-85.
- Ormo, M., Cubitt, A., Kallio, K., Gross, L., Tsien, R. and Remington, S. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* **263**: 802-805.
- Orozco E., Guarneros G., Martínez-Palomo A. and Sánchez T. 1983. *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.* **158**: 1511-521.
- Ortiz D., del Carmen Dominguez-Robles M., Villegas-Sepulveda N. and Meza I. 2000. Actin induction during PMA and cAMP-dependent signal pathway activation in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Cell Microbiol.* **2**(5): 391-400.
- Pelham, H.R. 1989. Control of protein exit from endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**: 1-23.
- Pérez-Tamayo, R. 1986. Pathology of amebiasis. In: Amebiasis. A. Martínez-Palomo (ed.) Amsterdam Elsevier Biomedical. p.p. 54-94.
- Prasher, D., Eckenrode, V., Ward, W., Prendergast, F. and Cormier, M., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* **111**: 229-33.

- Purdy J.E., B.J. Mann, L.T. Pho and W.A. Petri, Jr. 1994. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of the firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7099-7103.
- Purdy J.E., L.T. Pho, B.J. Mann and W.A. Petri, Jr., 1996. Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol Biochem Parasitol* **78**: 91-103.
- Ramos M. A., Mercado G. C., Salgado L. M. et al. 1997. *Entamoeba histolytica* contains a gene encoding a homologue to the 54 kDa subunit of the signal recognition particle. *Mol. Biochem. Par.* **88**: 225-35.
- Ravdin, J. I. 1995. Amebiasis. *Clin. Infec. Dis.* **20**: 1453-1466.
- Rinat A.N., Bracha R, Mirelman D. 1997. Inhibition of expression of the lysine-rich 30 kDa surface antigen of *Entamoeba dispar* by the transcription of its antisense RNA. *Mol Biochem Parasitol.* **90**(1): 193-201.
- Rodríguez, M. A., Orozco E. 1986. Isolation and characterization of phagocytosis-and virulence deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J.Infect. Dis.* **154** : 27-32.
- Rodríguez M.A., García-Pérez R.M., Garcia-Rivera G., López-Reyes I., Mendoza L, Ortiz-Navarrete V. and Orozco E. 2000. An *Entamoeba histolytica* rab-like encoding gene and protein: function and cellular location. *Mol Biochem Parasitol.* **108**(2): 199-206.
- Rosenbaum R.M., Wittner M., 1970. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell. Biol.* **45**: 367-82.
- Rothman, J. E., 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* **372**: 55-63.
- Saito-Nakano Y., Yasuda T., Shigeta Y., Nakazawa M., Takeuchi T., Nozaki T. 2000. Identification and characterization of a Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* **31**(4 Suppl): S155-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. 2^a edición.
- Sanchez- López R., Gama-Castro S., Ramos M. A., Merino E., Lizardi P. M. Alagón 1998. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**: 355-9.
- Sanchez-López R., Gutiérrez A., Ramos M.A., Alagón A. 2000. Cloning of the *Entamoeba histolytica* STT3 gene, a subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Arch Med Res.* **31**(4 Suppl): S162-4.
- Semenza, JC Hardwick KG and Dean, N Pelham HRB. 1990. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* **61**: 1349-1357.
- Scales, S.J., Ppferkok, R. y Kreis, T.E. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI, *Cell* **90**: 1137-1148.
- Scholze, H., Tannich, E. 1994. Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol.* **244**: 512-523.
- Serrano R., Deas J. E., Warren L. G. *Entamoeba histolytica*: membrane fractions. *Exp. Parasitol.* 1977; **41**: 370-84.
- Sudhof, T. C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* **375**: 645-653.

- Talamas-Rohana, P. y Meza, I. 1988. Interaction between pathogenic amebae and fibronectin: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J Cell Biol* **120**: 577-585.
- Tanaka T., Tanaka M., Mitsui Y. 1997. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of the parasitic protozoa, *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res. Commun* **236**: 611-5.
- Teasdale D.R. y Jackson M.R., 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 27-54.
- Temesvari L. A., Harris E. N., Stanley S. L., Cardelli J. A. 1999. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol* **103**: 225-41.
- Tovar, J., Fischer, A., Clark, C. G. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1013-1021.
- Treviño García-Manzo, N., Escandón-Romero, C., Escobedo J., Hernández-Ramos, J.M. y Fierro-Hernández, H. 1994. Amebiasis in the epidemiologic transition in México: its morbidity and mortality trends in the Mexican Institute of the Social Security. *Arch. Med. Res.* **25**: 393-399.
- Tsien Y., (1998) The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509-44.
- Vargas-Rodríguez L., Villagómez-Castro J. C., Flores-Carreón A. and López-Romero E. 1998. Identification and characterization of early reactions of asparagine – linked oligosaccharide assembly in *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol* ; **28**: 1333-40.
- Verdugo D. H., Espinosa-Castellano M., Martínez-Palomo A. 1997. Erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* **28**: 197-199.
- Villagómez-Castro J. C., Calvo-Méndez C., Vargas-Rodríguez L., Flores-Carreón A., López-Romero E. 1998. *Entamoeba histolytica*: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate manose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis. *Exp. Parasitol* **88**: 111-20.
- Vines R.R., J.E. Purdy, B.D., Regland, J., Samuelson, B.J., Mann and W.A. Petri, Jr. 1995. Stable episomal transfection of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **71** (), pp. 265-267.
- Walsh, J.A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Amibiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (Ed.). John Wiley y Sons. EUA. p.p. 93-105.
- Ward, W.W. and Bokman, S.H., 1982. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry.* **21**: 4535-40.
- World Health Organization. 1995. The World Health Report (World Health Organization, Geneva).
- http://www.clontech.com/techinfo/vectors_dis
- http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm#pbluescript_ii_ks_plus