

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL POSIBLE FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN Y CORTE/POLIADENILACIÓN
EhPC4 DE *Entamoeba histolytica*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIOL. OLGA NOHEMÍ HERNÁNDEZ DE LA CRUZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTORA

Dra. Laurence A. Marchat Marchau

Profesora Titular. Programa Institucional en Biomedicina Molecular

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN

ASESORAS

Dra. Esther Orozco Orozco

Profesora Titular. Departamento de Patología Experimental

CINVESTAV-IPN

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Mavil López Casamichana

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias al apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco.

El trabajo se realizó en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección del Dr. Mario César López Camarillo y con apoyo del laboratorio de la Dra. Laurence A. Marchat del Departamento de Biomedicina Molecular de la ENMyH-IPN y del laboratorio de la Dra. Esther Orozco del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN.

Esta tesis forma parte del proyecto “Análisis molecular de la maquinaria de procesamiento del 3´ terminal del pre-mRNA en *E. histolytica*” el cual ha sido apoyado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM, México), el Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) y la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación del IPN (DEPI, México).

Así mismo, agradezco al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el apoyo económico otorgado al proyecto mediante la convocatoria “Fondo de apoyo para proyectos culturales y científicos juveniles de la Ciudad de México 2007: Creación Joven”.

ÍNDICE	págs.
LISTA DE ABREVIATURAS.	i
LISTA DE FIGURAS.	iii
LISTA DE TABLAS.	v
RESUMEN.	vi
I. INTRODUCCIÓN.	1
1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA.	1
1.1 Regulación de la expresión génica en eucariontes.	1
1.2 Transcripción en eucariontes.	1
1.3 Procesamiento del pre-mRNA en eucariontes.	5
1.4 Corte y poliadenilación del extremo 3' del pre-mRNA en eucariontes.	7
1.5 El papel de PC4 en la regulación de la expresión génica.	11
2. ESTADO DEL ARTE	15
2.1 Generalidades de <i>Entamoeba histolytica</i> .	15
2.2 Epidemiología de la amibiasis.	15
2.3 Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> .	17
2.4 Taxonomía y filogenia de <i>E. histolytica</i> .	19
2.5 El Genoma de <i>E. histolytica</i> .	23
2.6 Transcripción en <i>E. histolytica</i> .	24
2.7 Maquinaria de corte y poliadenilación de <i>E. histolytica</i> .	26
3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	28
4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO.	29
II. OBJETIVOS.	30
1. Objetivo general.	30
2. Objetivos específicos.	30

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	31
1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.	31
1.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4 en las bases de datos del genoma de <i>E. histolytica</i> .	31
1.2. Búsqueda de ortólogos de EhPC4 mediante BLAST.	31
1.3. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de EhPC4 y sus ortólogos.	34
1.4. Análisis filogenético de la proteína EhPC4 y sus ortólogos.	34
1.5 Búsqueda de dominios funcionales y estructurales de EhPC4.	34
1.6 Determinación de la estructura secundaria y terciaria de EhPC4.	35
1.7 Determinación de las modificaciones postraduccionales de EhPC4.	35
2. Análisis de la expresión del mRNA del gen <i>Ehpc4</i> por RT-PCR en trofozoítos de las clonas A y L6 de <i>E. histolytica</i> .	35
2.1 Cultivos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	35
2.2 Extracción y cuantificación de RNA total de alta calidad.	36
2.3 Diseño y cuantificación de oligonucleótidos.	37
2.4 Determinación de la expresión del mRNA del gen <i>Ehpc4</i> mediante RT-PCR.	39
2.4.1 Pretratamiento con DNAsa I libre de RNAsa.	39
2.4.2 Retrotranscripción.	39
2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.	40
2.4.4 Análisis de los productos de PCR mediante geles de poliacrilamida.	40
3. Clonación del gen <i>Ehpc4</i> en el vector de expresión pRSET-A.	43
3.1 Obtención de DNA genómico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	43
3.2 Amplificación por PCR del gen <i>Ehpc4</i> a partir de DNA genómico de	

<i>E. histolytica</i> .	43
3.3 Purificación de los productos amplificados por PCR.	43
3.4 Clonación del gen <i>Ehpc4</i> en el plásmido pRSET-A.	44
3.5 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α por el método de CaCl ₂ .	45
3.6 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α por choque térmico.	46
3.7 Aislamiento del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> mediante lisis alcalina.	46
3.8 Análisis del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> mediante digestión con las enzimas de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.	47
3.9 Análisis del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> mediante PCR.	47
3.10 Expansión y purificación del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> .	48
3.11 Cuantificación del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> por espectrofotometría.	48
3.12 Secuenciación y análisis de la secuencia del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> .	48
4. Expresión y purificación de la proteína recombinante rEhPC4.	49
4.1 Características de la cepa de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.	49
4.2 Preparación de células competentes <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS.	49
4.3 Transformación por choque térmico de bacterias <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS con pRSET- <i>Ehpc4</i> .	50
4.4 Inducción de la expresión de la proteína rEhPC4 en células de <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS.	50
4.5 Análisis de la expresión de rEhPC4 mediante SDS-PAGE y por Western Blot.	51
4.6 Determinación de la solubilidad de la proteína rEhPC4.	52
4.7 Inducción de la expresión de EhPC4 en cultivos masivos de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.	53

4.8 Purificación de la proteína rEhPC4 por cromatografía de afinidad con gradiente de imidazol.	53
4.9 Análisis de las fracciones de purificación mediante SDS-PAGE y Western Blot.	53
4.10 Purificación de la proteína rEhPC4 mediante electroelusión.	54
4.11 Cuantificación de la proteína rEhPC4 por el método de Bradford.	54
5. Generación de anticuerpos policlonales específicos para EhPC4.	55
5.1 Protocolo de inmunización en conejo.	55
5.2 Obtención del suero preinmune e inmune.	56
5.3 Análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-EhPC4 mediante Western blot.	56
6. Localización de la proteína EhPC4 en extractos nucleares y citoplasmáticos de <i>E. histolytica</i>.	58
6.1 Obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .	58
6.2 Localización de EhPC4 en extractos nucleares y citoplasmáticos de <i>E. histolytica</i> mediante Western blot.	59
7. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética.	59
7.1 Amplificación, purificación y cuantificación del fragmento de DNA de 174 pb.	59
7.2 Marcaje con α - ³² P[dATP] del fragmento de 174pb dsDNA, purificación y cuantificación de la sonda de 174pb.	60
7.3 Preparación de la proteína rEhPC4.	61
7.4 Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética.	62
V. RESULTADOS.	65

1. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.	65
2. Análisis de la expresión del mRNA del gen <i>Ehpc4</i> por RT-PCR en trofozoítos de las clonas A y L6 de <i>E. histolytica</i> .	79
3. Clonación del gen <i>Ehpc4</i> en el vector de expresión pRSET-A.	81
4. Expresión y purificación de la proteína rEhPC4.	85
5. Generación de anticuerpos policlonales específicos para EhPC4.	94
6. Localización la proteína EhPC4 en extractos nucleares (EN) y citoplasmáticos (EC) de <i>E. histolytica</i> .	96
7. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética para determinar la afinidad de la proteína rEhPC4 a dsDNA.	98
VI. DISCUSIÓN.	103
VII. APÉNDICE (soluciones).	107
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	109

LISTA DE ABREVIATURAS

3´ UTR	Región 3´ no traducida
5´ UTR	Región 5´ no traducida
6xHis	Etiqueta de 6 histidinas
α - ³² P[dATP]	Desoxi-adesintrifosfato marcado con fósforo ³²
α -6xHis	Anticuerpo anti-etiqueta de 6 histidinas
aa	Aminoácidos
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
cDNA	Ácido Desoxirribonucleíco complementario
CTD	Dominio Carboxilo Terminal
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
dNTP´s	Desoxi Nucleótidos Trifosfatados
D.O.	Densidad Óptica
ds174	Fragmento de DNA de 174 pb
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleótido de Doble Cadena
dT	Desoxitimidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetra-acético
EhPC4	Proteína Coactivadora Positiva 4 de <i>E. histolytica</i>
EC	Extracto Citoplasmático
EN	Extracto Nuclear
h	Horas
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
L	Litros

mA	Miliamperios
min	Minuto
ml	Mililitros
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] Propano Sulfónico
mRNA	RNA mensajero
nt	Nucleótidos
PAGE	Electroforésis en Gel de Poliacrilamida
pb	Pares de Bases
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PC4	Proteína Coactivadora 4 de <i>H. sapiens</i>
PC4-CTD	Dominio Carboxilo Terminal de PC4
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIC	Complejo de Preinicio de la Transcripción
pre-mRNA	RNA mensajero precursor
pRSET- <i>Ehpc4</i>	Plásmido pRSET con el gen <i>EhPC4</i> clonado
rEhPC4	Proteína recombinante PC4 de <i>E. histolytica</i>
RNA	Ácido ribonucleíco
RNA pol II	Polimerasa de RNA tipo II
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de amonio
ssDNA	Ácido desoxirribonucleótido de cadena sencilla
µl	Microlitros
U	Unidades
v	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ensamblaje del Complejo de Preinicio de la Transcripción.	3
Figura 2. Maquinaria de corte y poliadenilación de <i>H. sapiens</i> .	10
Figura 3. Interacción entre los factores de transcripción y poliadenilación durante la transcripción.	13
Figura 4. Ciclo de vida del parásito <i>E. histolytica</i> .	18
Figura 5. Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de <i>cpn60</i> .	21
Figura 6. Modelo hipotético del la maquinaria de procesamiento del extremo 3' del mRNA en <i>E. histolytica</i> .	27
Figura 7. Estrategia experimental.	32
Figura 8. Condiciones de amplificación por PCR empleados para el gen <i>Ehpc4</i> .	42
Figura 9. Esquema de inmunización en conejo.	57
Figura 10. Secuenciación del gen <i>Ehpc4</i> clonado en pRSET.	70
Figura 11. Alineamiento de EhPC4 con sus proteínas ortólogas.	72
Figura 12. Inferencia filogenética de EhPC4 y sus proteínas ortólogas.	73
Figura 13. Dominios funcionales y motivos estructurales de la proteína EhPC4.	74
Figura 14. Sitios de fosforilación predichos por el programa MOTIV SCAN para la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.	75
Figura 15. Estructura secundaria consenso predicha para EhPC4.	77
Figura 16. Comparación de la estructura terciaria de EhPC4 con la de PC4 de humano.	78
Figura 17. Análisis de la expresión del mRNA de lo genes <i>Ehpc4</i> y <i>actina</i> en las	

clonas A y L6 de <i>E. histolytica</i> .	80
Figura 18. Representación esquemática del gen <i>Ehpc4</i> clonado en el plásmido pRSET-A en los sitios de restricción <i>Bam</i> H1 y <i>Hind</i> III.	82
Figura 19. Análisis de los plásmidos candidatos para verificar la clonación del gen <i>Ehpc4</i> en el plásmido pRSET-A.	83
Figura 20. Resultados de la secuenciación del plásmido pRSET- <i>Ehpc4</i> .	84
Figura 21. Expresión de la proteína rEhPC4 en células BL21(DE3)pLysS Transformados con pRSET- <i>Ehpc4</i> .	87
Figura 22. Prueba de solubilidad para la proteína rEhPC4.	88
Figura 23. Expresión de rEhPC4 en cultivo masivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS inducido.	89
Figura 24. Purificación de rEhPC4 por columna de NiNTA.	91
Figura 25. Gel preparativo SDS-PAGE al 10% para la electroelusión de la proteína rEhPC4.	92
Figura 26. Western blot para verificar la identidad de la proteína rEhPC4 purificada.	93
Figura 27. Western Blot de la proteína rEhPC4 con el suero preinmune e inmune.	95
Figura 28. Localización de EhPC4 en extractos nucleares y citoplásmicos mediante inmunodetección.	97
Figura 29. Características del fragmento ds174 empleado para los ensayos de retardamiento.	100
Figura 30. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética.	101
Figura 31. Ensayo de superretardamiento.	102

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>E. histolytica</i> .	22
Tabla II. Características de PC4 de <i>H. sapiens</i> .	33
Tabla III. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR de los genes <i>Ehpc4</i> y <i>actina</i> .	38
Tabla IV. Reactivos y sus respectivas concentraciones empleadas para la reacción de PCR para la amplificación de los genes <i>Ehpc4</i> y <i>actina</i> .	41
Tabla V. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento ds174 por PCR.	60
Tabla VI. Reactivos y sus respectivas concentraciones empleadas para cada una de las reacciones de unión proteína-dsDNA.	64
Tabla VII. El genoma de <i>E. histolytica</i> presenta un gen homólogo a PC4 de humano.	69
Tabla VIII. Proteína EhPC4 y sus ortólogas de diversos organismos.	71

RESUMEN.

En *E. histolytica*, el agente causal de la amibiasis humana, los mecanismos que regulan la transcripción de sus genes y el procesamiento del pre-mRNA son poco conocidos. Desde hace tiempo, nuestro grupo de trabajo ha estado trabajando en la caracterización de los componentes de la maquinaria de corte y poliadenilación. En el 2005 reportamos la maquinaria hipotética de corte y poliadenilación del pre-mRNA en éste microorganismo, donde se detectó una secuencia que codifica para una proteína hipotética homóloga a PC4 de *H. sapiens* que denominamos EhPC4. En base a lo que se sabe de PC4, EhPC4 posiblemente participa en la transcripción y poliadenilación de los mRNAs de *E. histolytica*, por lo tanto, decidimos estudiarla. En el presente trabajo nos enfocamos en la caracterización inicial de ésta proteína a nivel molecular e *in silico*. El análisis *in silico* mostró que el genoma de *E. histolytica* presenta una sola copia del gen de 477 pb que codifica para la proteína EhPC4, la cual está constituida por 151 aa (18 kDa) y comparte porcentajes de similitud (76-61 %) e identidad (30-46 %) significativos, con proteínas relacionadas de eucariontes unicelulares y multicelulares. Un alineamiento entre EhPC4 y sus proteínas ortólogas mostró que la región más conservada entre ellas es un dominio ubicado en la región C-terminal (a excepción de Sub 1 de *S. cerevisiae*, que cae en su región N-terminal), dentro del cuál se encuentran 9 aminoácidos (F, R, E, P, K, G, I, S y L) que son idénticos en todas las secuencias estudiadas. Se ha demostrado que 4 de ellos (F, R, P y K) participan en la interacción de la proteína PC4 con el DNA. Así mismo, se infirió que EhPC4 presenta un dominio denominado PC4 y un dominio de unión al DNA, sobrelapados en su región C-terminal. Además, su secuencia presenta sitios potenciales para el reconocimiento de varias cinasas CKII, PKC y TYR. Posteriormente, se determinó la expresión del mRNA del gen *Ehpc4* en trofozoítos de *E. histolytica* HMI:IMSS clona A mediante ensayos de RT-PCR. Adicionalmente, se amplificó y clonó el gen *Ehpc4* en el vector pRSET-A. La proteína rEhPC4 fue expresada en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y purificada por cromatografía de afinidad. La proteína rEhPC4 pura fué empleada para generar anticuerpos policlonales específicos que se utilizaron para determinar la localización subcelular de la proteína EhPC4 en extractos celulares de *E. histolytica*. Nosotros detectamos a EhPC4 exclusivamente en extractos nucleares. Así mismo, rEhPC4 se empleó para realizar ensayos de retardamiento donde observamos que EhPC4 presenta la capacidad de unirse a una sonda de dsDNA de manera específica.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 Regulación de la expresión génica en eucariontes.

Los genomas de los eucariontes varían considerablemente en tamaño en las diferentes especies, desde 10 Mb en hongos hasta 10,000 Mb en algunas plantas con flor. Lo que varía mucho menos es el número de genes contenidos en estos genomas, que típicamente presentan entre 5000 y 25,000. Comparados con los genomas procariontes, los eucariontes presentan genomas menos compactos y con una densidad génica relativamente baja. Se ha observado que sólo una pequeña parte del genoma contiene información para generar proteínas, mientras que la mayor parte del DNA participa en la regulación de la expresión de las secuencias codificantes (W. S. Klug y cols. 2006).

La enorme complejidad de los eucariontes hace necesaria una amplia diversidad de mecanismos que permitan regular la expresión de los genes contenidos en su genoma, lo que a su vez permite el óptimo funcionamiento de los organismos. En células eucariontes la regulación de la expresión de la información genética se regula a diferentes niveles, de manera general, a nivel transcripcional, a nivel del procesamiento co-transcripcional del pre-mRNA y a nivel traduccional.

1.2 Transcripción en eucariontes.

La transcripción de los genes se lleva a cabo en el interior del núcleo de las células eucariontes y permite que la información que se encuentra almacenada en una de las dos cadenas del DNA se transfiera a una secuencia de RNA. El resultado de éste proceso es una molécula de RNA de cadena sencilla complementaria a la secuencia del DNA. Dicha molécula, que actúa como portadora de la información genética, cuando se está sintetizando se denomina RNA mensajero precursor (pre-mRNA), la cual después de ser procesada, se convierte en una molécula conocida como RNA mensajero (mRNA), que es la encargada de llevar la información que inicialmente se encontraba codificada en el DNA al citoplasma, para que sea empleada para la síntesis de proteínas. La importancia del proceso de transcripción es enorme, puesto que representa el inicio del flujo de información genética dentro de la célula.

La transcripción es un proceso complejo que presenta múltiples pasos y por convención se ha dividido en tres etapas: inicio, alargamiento y terminación.

El inicio de la transcripción comienza con la formación de un complejo multiproteico que en conjunto se conoce como “Complejo de Preinicio de la Transcripción” (por sus siglas en inglés, PIC), el cuál reconoce e interacciona con las regiones promotoras, que son secuencias específicas de DNA ubicadas en la región 5´ río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen. En la **Figura 1** se observa un esquema de la composición del PIC y su mecanismo de ensamble durante el inicio de la activación transcripcional. Así mismo, existen secuencias en el DNA que se denominan potenciadores que participan en el inicio de la transcripción, los cuáles pueden estar cercanas al promotor, dentro del gen e incluso en la región 3´ río abajo del gen más allá de la secuencia codificante (Anthony J. F. Griffiths y cols. 2004). El PIC está formado por proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución de los eucariontes y que actúan como intermediarias de la activación génica. Dichas proteínas son de diferentes tipos: 1) factores basales o generales de la transcripción (GTF´s), que se caracterizan por reconocer los promotores de muchos genes diferentes, 2) proteínas activadoras y coactivadoras que actúan en *trans* de manera específica y 3) la enzima RNA polimerasa II (RNA pol II).

Los factores generales de la transcripción forman una plataforma de unión de la RNA pol II al promotor y estimulan la transcripción de los genes a un nivel basal. Las proteínas activadoras y represoras actúan como factores que incrementan o reprimen, respectivamente, la transcripción, determinando el sitio, el momento y la tasa de expresión de los genes.

Los organismos eucariontes emplean en general tres tipos de RNA polimerasas para la transcripción de sus genes: las de tipo I son las encargadas de sintetizar el RNA ribosómico; las de tipo II son empleadas durante la transcripción de genes que codifican proteínas y RNAs pequeños nucleares; y las de tipo III para los genes de tRNAs, rRNA 5S y otros RNAs celulares pequeños (P. Cramer, 2004). La RNA pol II se compone de 12 subunidades proteicas y el dominio carboxilo terminal (CTD) de su subunidad mayor presenta sitios de reconocimiento a varios tipos de cinasas, las cuáles van a estar modulando su funcionamiento durante la transcripción (S. Buratowski, 2003).

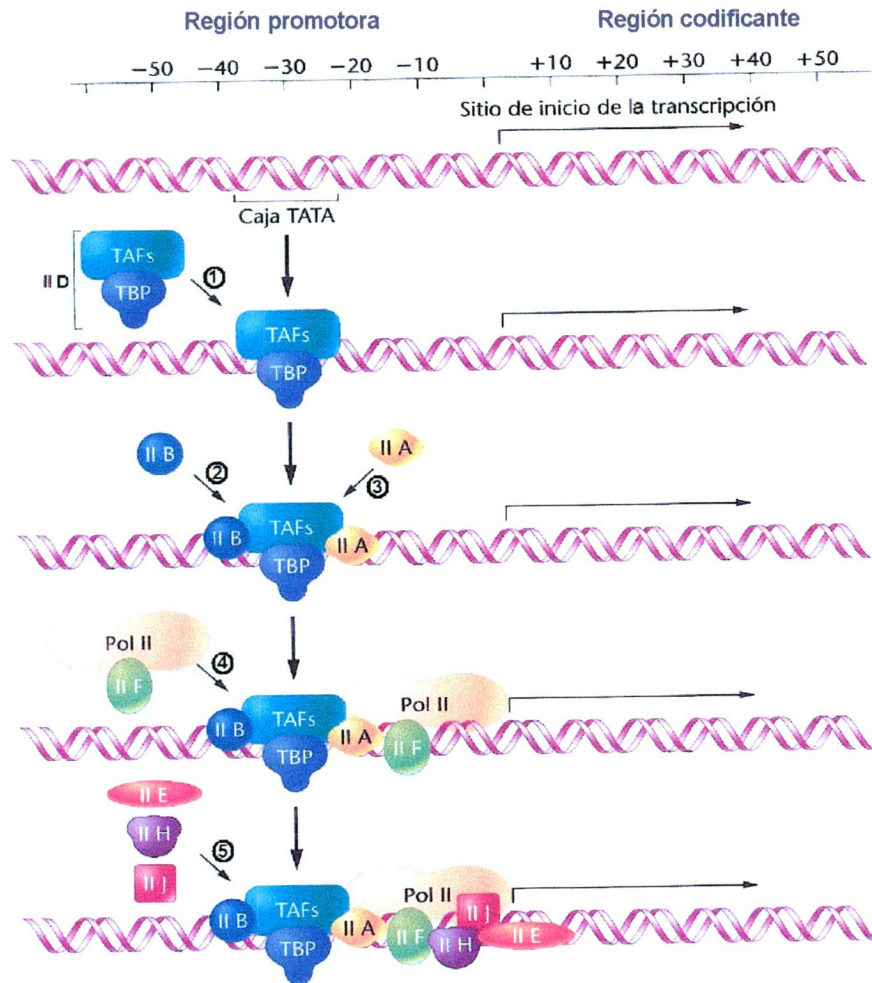


Figura 1. Ensamble del complejo de preinicio de la transcripción. El PIC tiene la función de proporcionar una plataforma para que la RNA pol II reconozca y se una a la región promotora de los genes que se deben de transcribir. Durante el inicio de la formación del PIC, un complejo proteico denominado TFIID reconoce aproximadamente unos 20 pb de la región promotora de los genes y se une a la caja TATA (1), en los promotores que contienen esta secuencia, a través de una de sus subunidades denominada TBP (proteína de unión a la caja TATA). TFIID está compuesto por TBP y por aproximadamente otras 13 proteínas más denominadas TAFs (factores asociados a TBP). En el promotor, TFIID interactúa con proteínas activadoras de la transcripción que a su vez facilitan su interacción con otros factores generales de la transcripción como es TFIIB. TFIIB es una proteína que interacciona con TBP y con secuencias del promotor ubicadas río arriba de la caja TATA (2). Una vez que están reclutados estos factores en el PIC, TFIIA (3), la RNA pol II (4) y otros factores adicionales como TFIIF, TFIIIE, TFIIH y TFIIJ se incorporan (5), formando de ésta manera el PIC, y es entonces cuando la RNA pol II inicia la transcripción del gen adyacente (W. S. Klug y cols. 2006).

La RNA pol II que en un principio se desplazaba a lo largo de las cadenas de DNA, reconoce las regiones promotoras de los genes que se van a transcribir debido a la presencia de los componentes del PIC y se une a ellas, abarcando proximalmente unos 60 pb del DNA, 40 de los cuáles están río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Cuando el PIC está formado en su totalidad, se puede iniciar la transcripción, la RNA pol II comienza la catálisis de los primeros ribonucleótidos trifosfato 5´, los cuáles son complementarios a los primeros nucleótidos del sitio de inicio de la transcripción en la cadena de DNA molde, dándose así, el inicio a la síntesis del pre-mRNA.

Durante el alargamiento del pre-mRNA, se lleva a cabo la polimerización de la molécula de RNA la cuál prosigue en dirección 5´- 3´ mediante la inserción de ribonucleótidos complementarios, formando un duplex de DNA-RNA temporal. Mientras el pre-mRNA se está sintetizando, al mismo tiempo la molécula se va modificando mediante una serie de eventos que en su conjunto se han denominado “mecanismos de procesamiento del pre-mRNA”. Estos mecanismos comprenden: la adición en su extremo 5´ de una estructura química denominada “cap” durante el proceso conocido en inglés como *capping*; la eliminación de los intrones, que son fragmentos de DNA no codificante de tamaño variable dentro de la secuencia codificante del pre-mRNA, mediante el proceso conocido en inglés como “*splicing*”; y finalmente, el corte y adición en su extremo 3´ de una cola de poli(A) mediante el proceso denominado corte y poliadenilación. Dichos mecanismos de procesamiento son necesarios para generar una molécula de mRNA madura, capaz de ser transportada del núcleo al citoplasma y ser reconocida por los ribosomas, que en última instancia, van a descifrar la información contenida en la molécula mensajera para dirigir la síntesis de proteínas (W. S. Klug y cols. 2006).

Aunque cada uno de los mecanismos de procesamiento del pre-mRNA pueden llevarse a cabo de manera independiente *in vitro*, en los últimos años se han recopilado evidencias que indican que *in vivo* dichas modificaciones están altamente coordinadas e influenciadas unas por otras (A. Parent y cols., 2004).

1.3 Procesamiento del pre-mRNA en eucariontes.

Cuando la RNA pol II ha polimerizado aproximadamente entre los 10-20 primeros ribonucleótidos del pre-mRNA naciente, se lleva a cabo su primera modificación, el *capping*. Durante este proceso se le adiciona al primer ribonucleótido del extremo 5' una estructura química denominada "cap" que es una guanosina metilada en la posición 7, mediante un conjunto de reacciones secuenciales de 3 enzimas. La primera reacción involucra la hidrólisis del primer trifosfato del extremo 5' por una RNA trifosfatasa, la cuál deja un difosfato en ese extremo y que va a ser reconocido por una RNA guanililtransferasa (o enzima de *capping*) que le adiciona una guanosina. Finalmente, la guanosina es metilada por una RNA (Guanina-N7) metiltransferasa. El *cap* juega un papel crítico en la estabilidad, transporte y traducción de los mRNAs. Se ha observado que la presencia del *cap* protege a los mRNAs de su degradación por exonucleasas en dirección 5' - 3' (C. A. Beelman and R. Parker, 1995). El complejo de unión a *cap*, formado por las proteínas CBP20 y CBP80, reconoce la guanosina metilada protegiendo a los pre-mRNAs de degradación y promueve su transporta al citoplasma (A. J. Shatkin and J. L. Manley, 2000). En el citoplasma, el *cap* interacciona con el factor de inicio de la traducción eIF-4E incrementándose significativamente la traducción de los mRNAs debido a que se incrementa su interacción con los ribosomas (A. B. Sachs y cols., 1997).

Durante el alargamiento del pre-mRNA se lleva a cabo el *splicing*, durante éste proceso las regiones intrónicas, muy comunes en genes eucariontes, son removidas dejando solamente los exones, es decir, las secuencias codificantes del pre-mRNA. Dichos eventos son mediados por la maquinaria de *splicing*, también conocida como spliceosoma, que está formada por 5 RNAs pequeños nucleares (U1, U2, U4, U5 y U6) asociados a varias proteínas que en conjunto forman ribonucleoproteínas (snRNP). Otras proteínas que están presentes en el spliceosoma son las proteínas SR (serina/arginina) (A. Parent y cols., 2004). El corte y empalme de los pre-mRNAs es trascendental ya que permite cambios en la estructura y composición de bases del mRNA, en la expresión de las proteínas para las que codifica, e incrementa la diversidad de variantes de mRNA sintetizados para un determinado producto. El *splicing* puede alterar la composición de dominios, de tal manera que un gen puede dar origen a proteínas con diferentes características estructurales y funcionales.

El procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA es un mecanismo que se ha dividido en dos eventos consecutivos: 1) el reconocimiento de secuencias específicas en la región UTR 3' de los pre-mRNAs por proteínas que llevan a cabo un corte endonucleotídico en una posición específica y 2) la adición de un tracto de residuos de adeninas de tamaño variable en el sitio de corte por la enzima poli(A) polimerasa. El corte y la posterior poliadenilación de los pre-mRNAs son importantes para la estabilidad y regulación de la función de los mRNA. Un incremento en la longitud del tracto de poli(A) está asociado a un incremento en su tasa de traducción y a una mayor eficiencia de exportación hacia el citoplasma. Variaciones en la longitud del tracto de poli(A) se asocian así mismo a cambios en la estabilidad del mRNA, y su completa remoción desencadena la degradación de los transcritos (M. Ares, Jr. y Nick J. Proudfoot, 2005).

Uno de los más inesperados e importantes descubrimientos en el campo de la expresión génica durante los últimos años ha sido determinar el grado con el que la transcripción está acoplada al procesamiento del pre-mRNA para dar origen a un mRNA maduro (A. Parent y cols., 2004). Varias de las maquinarias que participan en la regulación de la expresión génica interactúan físicamente y funcionalmente entre sí, y dicha interacción no sólo se da entre pasos secuenciales, sino también, entre los pasos iniciales y finales de la expresión, como es el acoplamiento del inicio de la transcripción y el procesamiento del pre-mRNA. El acoplamiento entre maquinarias permite resolver muchos de los problemas inherentes de las vías de la expresión génica, como por ejemplo, el acoplamiento de la transcripción con el *capping* permite que el mRNA naciente sea protegido de la degradación enseguida de ser sintetizado. Así mismo, el acoplamiento de la transcripción y el procesamiento del extremo 3' promueve que los mensajeros una vez que se han transcrito completamente, sean cortados y poliadenilados inmediatamente (T. Maniatis and R. Reed, 2002).

Los mRNAs de los eucariontes son transcritos exclusivamente por la RNA pol II, la cuál coopera con numerosos factores del procesamiento del pre-mRNA, de manera que el acoplamiento entre las maquinarias de transcripción y de procesamiento involucran de manera determinante a ésta enzima, específicamente a su CTD, y a los factores de elongación de la transcripción, los cuáles, juegan también un papel central (A. J. Shatkin and J. L. Manley, 2000). Se sugiere que el CTD funciona como un regulador transcripcional y como plataforma de reclutamiento, ensamblaje y coordinación de las

maquinarias de procesamiento, influyendo de manera crítica en la estabilidad, actividad y eficiencia de dichos complejos proteicos. Se ha observado que ciertas deleciones en el CTD no inactivan la transcripción pero si decrecen significativamente la eficiencia de las reacciones del procesamiento del pre-mRNA, así mismo, se ha observado que la fosforilación del CTD es requerida *in vivo* para el *splicing* y la poliadenilación del pre-mRNA (G. Bird, D. Zorio y D. Bentley, 2004).

El CTD de la RNA pol II consiste en repetidos (27 copias en levadura y 52 en humanos) de 7 aa, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, los cuales son modificados post-traduccionalmente mediante fosforilación de serinas, e isomerización de las prolinas, dando como resultado patrones específicos de modificaciones químicas conocido como el código del CTD que dirigen cambios conformacionales de su estructura terciaria (S. Buratowski, 2003). Esto permite por una parte la regulación de sus funciones, y por otra, configuraciones altamente específicas que permiten su interacción con una gran variedad de proteínas de las maquinarias de procesamiento temprano (como las del *capping*) o tardío (como las de la poliadenilación) del pre-mRNA. De manera que, dependiendo del sitio y del tipo de modificaciones que se llevan a cabo en el CTD, éste puede distinguir entre las fases tempranas o tardías de la transcripción e interaccionar con diferentes factores de procesamiento en el momento preciso y regular de manera muy fina estos procesos (Stephen Buratowski, 2003).

1.4 Corte y poliadenilación del extremo 3´ del pre-mRNA en eucariontes.

La poliadenilación consiste en la adición de una cola de poli (A) de 200 a 500 residuos de adenosinas. Para que se lleve a cabo éste proceso, los pre-mRNAs presentan en su extremo 3´ señales de poliadenilación con secuencias altamente conservadas, que son reconocidas por una serie de proteínas que componen la compleja maquinaria de corte y poliadenilación. Las señales de poliadenilación comprenden básicamente 3 secuencias: la señal de poliadenilación AAUAAA altamente conservada localizada entre 10-30 nt río arriba del sitio de corte, un elemento rico en U ó GU localizado río abajo del sitio de corte y el sitio de corte, que en *H. sapiens* es el dinucleótido CA (A. Parent y cols., 2004).

Muchos de los factores involucrados en el corte y poliadenilación en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* han sido caracterizados en los últimos años y se ha observado que son

altamente conservados. Aunque se conoce poco acerca de los detalles y las diferencias entre los sistemas, el mecanismo de corte y poliadenilación parece ser universal (A. Parent y cols., 2004). En la **Figura 2** se muestra un modelo simplificado de los componentes básicos de esta maquinaria en humano (O. Calvo y J. Manley, 2003).

La secuencia AAUAAA es reconocida por un complejo multiproteico conocido como el factor específico de corte y poliadenilación (CPSF), que está compuesto por 4 subunidades de 30, 70, 100 y 160 kDa, ésta última CPSF-160 es la que interacciona directamente con la señal de poliadenilación. El factor estimulante de corte (CstF), que se compone por 3 subunidades de 50, 64 y 77 kDa, interactúa con la región rica en U/GU a través de su subunidad de 64 kDa (CstF-64), dicha interacción incrementa además la afinidad de CPSF-160 por el hexanucleótido AAUAAA. Las proteínas involucradas en el reconocimiento del sitio de corte del extremo 3' del pre-mRNA y en el corte son conocidos como los factores de corte (CF I y II). La enzima poli(A) polimerasa (PAP) está involucrada en la reacción de corte y a partir del extremo que se genera, ésta cataliza la adición de los residuos de adenosinas que dan origen al tracto de poli(A). La proteína II de unión a la cola de poli(A), denominada PABP II, incrementa significativamente la procesividad de la PAP y participa en el control de la longitud de las colas. La RNA pol II participa facilitando las interacciones proteína-proteína. Así mismo, otras proteínas participan en el proceso, como PC4 que interacciona con CstF-64, Ssu72 que tiene un importante pero desconocido papel en el ensamble y función de la maquinaria de poliadenilación, la simplequina que interacciona con CstF-64 en un dominio distinto al de PC4 y que se ha propuesto como un factor que facilita o mantiene el ensamble del complejo CstF. Ya que PC4 y Ssu72 interactúan con la simplequina de manera mutuamente excluyente, se ha propuesto a Ssu72 como un interruptor que desplaza a PC4, o bien que participa en promotores PC4-independientes (O. Calvo y J. Manley, 2003). Así mismo participa la PABP I, que se une a la cola de poli(A) y al mismo tiempo puede interactuar con el factor eIF4G, que es un componente del complejo eIF4F, promoviendo así la circularización de los mRNAs, confiriéndoles protección de sus extremos ante exonucleasas e incrementando su tasa de traducción debido a que esto facilita la reiniciación de los ribosomas (A. Parent y cols., 2004).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, se ha visto que ciertos factores de poliadenilación como CPSF y CstF pueden asociarse al CTD de la RNA pol II

durante el inicio, alargamiento y la terminación de la transcripción, facilitando la terminación de la transcripción, así como el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA. También se sabe desde hace varios años que mutaciones en las secuencias de poliadenilación afectan la terminación de la transcripción, lo cual indica una asociación entre la terminación y el procesamiento del mRNA (O. Calvo y J. Manley, 2003).

La terminación de la transcripción, la poliadenilación y la liberación del mRNA del sitio de transcripción, son los últimos pasos en la producción de un mRNA maduro y están altamente acoplados entre sí. Si cualquiera de estos pasos se da de manera prematura, puede resultar en un mRNA incompleto, parcialmente procesado y disfuncional, el cual tendrá que ser eliminado. Si la RNA pol II no termina la transcripción en el sitio correcto, se generan mRNAs aberrantes con regiones UTR 3' muy largas, los cuales son degradados rápidamente mediante un mecanismo de degradación del RNA conocido como "mRNA surveillance". Se han propuesto varios modelos para acoplar la terminación de la transcripción con la poliadenilación, pero a la fecha no se tiene una visión completamente clara de este mecanismo. Una hipótesis señala que cuando la RNA pol II transcribe las señales de poliadenilación en el pre-mRNA, los demás componentes de la maquinaria de corte y poliadenilación que se encuentran interaccionando con ella se liberan, e inmediatamente se unen de manera específica a las señales de poliadenilación, esto produce que la RNA pol II pase por cambios conformacionales que disminuyen su afinidad hacia el templado del DNA, y como consecuencia deja de añadirle ribonucleótidos. Así, el proceso de transcripción se termina, el pre-mRNA se libera del molde de DNA y se inicia el corte y la poliadenilación.

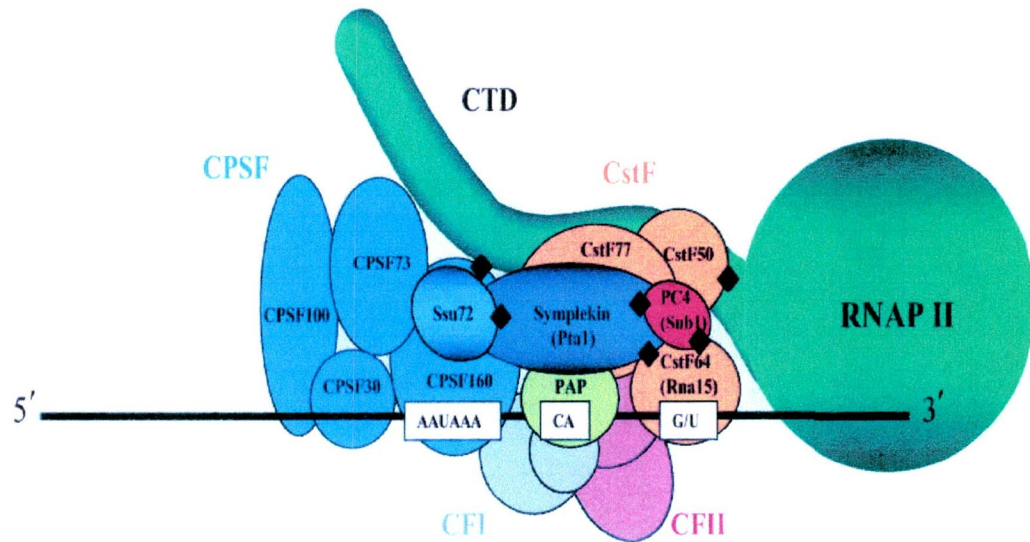


Figura 2. Maquinaria de corte y poliadenilación de *H. sapiens*. La mayoría de los componentes de los complejos son conservados en mamíferos y levadura, incluyendo todos los factores conocidos actualmente que funcionan como vínculo con la transcripción. La nomenclatura usada aquí es de humano y los homólogos en levadura se muestran en paréntesis. Los rombos negros representan las interacciones proteína-proteína que han sido reportadas y que promueven una conexión entre la transcripción y el procesamiento del 3' del pre-mRNA. En los rectángulos blancos se muestra la secuencia de la señal de poliadenilación AAUAAA, el elemento rico en G/U y el sitio de poliadenilación (CA), respectivamente (O. Calvo O. y J. Manley, 2003).

1.5 El papel de PC4 en la regulación de la expresión génica

Recientemente se han obtenido evidencias que sugieren que el inicio y la terminación de la transcripción pueden estar ligados con la poliadenilación a través del factor de transcripción y poliadenilación PC4 (por sus siglas en inglés, Positive Coactivator 4) en humano.

PC4 inicialmente fue descubierto como un coactivador transcripcional, esto es, una proteína que permite la función de manera específica de activadores de la transcripción, debido a que promueve la interacción entre los activadores y los factores generales de la transcripción. La habilidad de PC4 para interactuar con GTF's y las proteínas activadoras facilita los primeros pasos en el ensamble del PIC, por lo tanto, PC4 es una proteína que promueve el inicio de la transcripción. Sin embargo, se ha sabe que PC4 también puede actuar como un represor del inicio de la transcripción, inhibiendo el arranque de la RNA pol II hasta que el PIC esté completo. La represión de la transcripción por PC4 se inhibe con la presencia del factor de transcripción TFIIH. Se sabe que TFIIH es el último componente que se recluta en el PIC, mientras el PIC no esté completo PC4 reprime el inicio de la transcripción de la RNA pol II, cuando TFIIH se recluta al PIC fosforila a PC4 inhibiendo su actividad represora, y como consecuencia se inicia la transcripción (A. Fukuda y cols., 2003). Esto sugiere que PC4 puede tener múltiples funciones, siendo una de ellas el permitir la formación de un PIC completo y activo antes del inicio de la transcripción.

Mediante ensayos de doble híbrido se ha determinado que PC4 interactúa con el factor de corte y poliadenilación CstF-64, el cuál a su vez interactúa con la RNA pol II, desde la formación del PIC hasta la terminación de la transcripción. Así mismo, mediante éste tipo de ensayos se ha verificado la interacción de los homólogos a PC4 y Cst-F64 en *S. cerevisiae*, los cuáles se han denominado Sub1 y Rna15, respectivamente, y se ha observado que son requeridos para una eficiente terminación de la transcripción y corte/poliadenilación (N. Lynn Henry y cols., 1996).

Se ha propuesto que PC4 funciona como un anti-terminador de la transcripción durante la elongación, ya que al estar unido a CstF-64 inhibe la actividad de éste factor estimulante de corte. Una vez que se han alcanzado y transcrito las señales de poliadenilación en el pre-mRNA, PC4 se disocia de CstF-64 liberándolo y permitiéndolo su

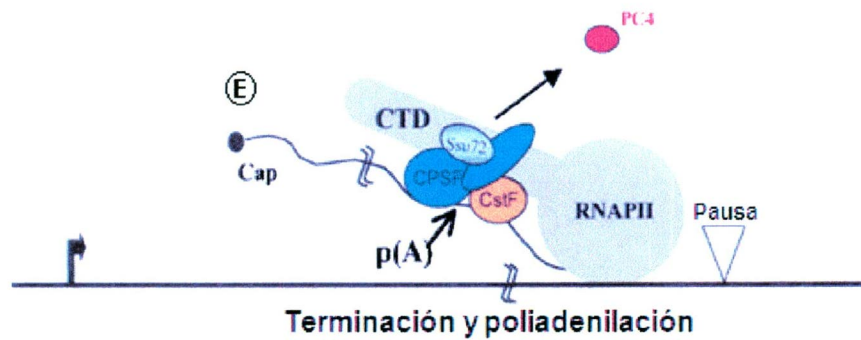
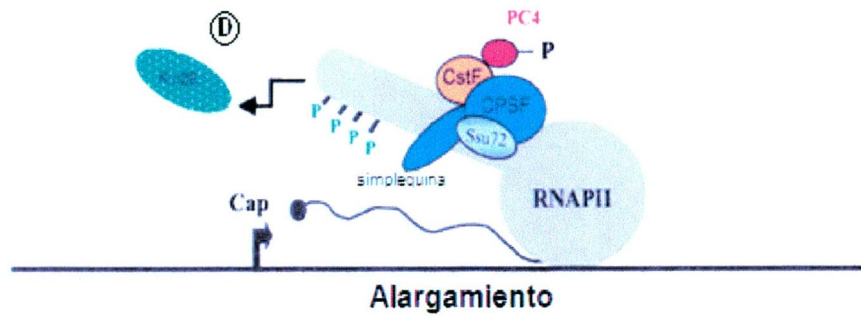
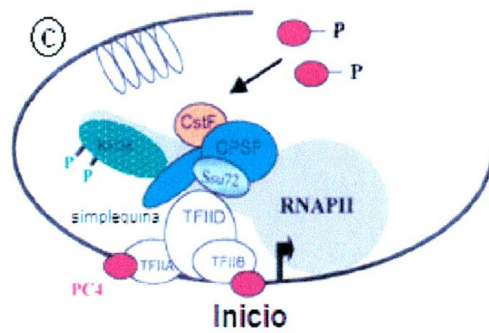
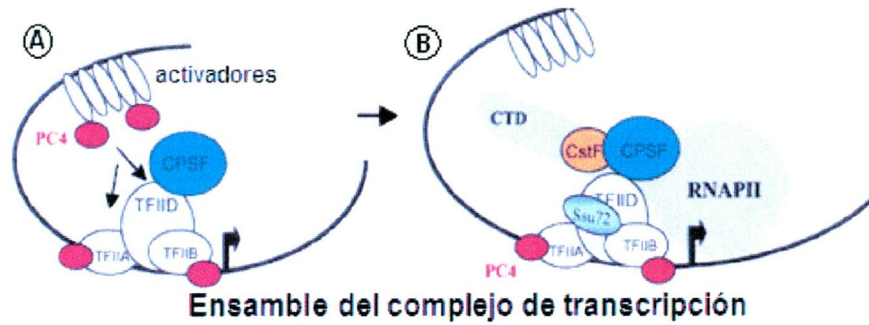
participación en la terminación de la transcripción y el inicio del corte y poliadenilación (O. Calvo y J. Manley, 2001).

Mediante experimentos donde se ha utilizado resonancia magnética nuclear para definir como es la interacción de PC4 con el DNA, se ha observado que PC4 tiene la capacidad de unirse a DNA de cadena sencilla (ssDNA) y de cadena doble (dsDNA) mediante su extremo carboxilo terminal (PC4-CTD) (R. A. Hendrik R., 2006). PC4 muestra una alta afinidad por regiones de DNA el donde las cadenas están parcialmente abiertas, por ejemplo en promotores parcialmente desnaturalizados (S. Wertern y cols., 1998).

En *S. cerevisiae* se han hecho estudios de Sub1 (también llamado Tsp1) y se ha observado que este factor purificado es capaz de incrementar la transcripción basal de la RNA pol II *in vitro*, de unirse a dsDNA y ssDNA, y de interactuar con el factor general de la transcripción TFIIB, así como con proteínas activadoras. Dichas interacciones parecen estar reguladas por fosforilación. Así mismo, se ha observado mediante deleciones de Sub1 que por si mismo no es esencial y que su sobreexpresión incrementa la expresión de muchos genes específicos (N. Lynn Henry y cols., 1996). Por lo tanto, se sugiere que PC4/Sub1 tiene la capacidad de interactuar con factores generales de la transcripción tales como TFIIB y con factores del procesamiento del extremo 3´ como CstF-64.

Uno de los modelos propuestos recientemente que tratan de integrar ciertas interacciones entre los factores de transcripción y poliadenilación es el que se muestra en la **Figura 3**. Este modelo es atractivo debido a que eventos que ocurren en etapas tempranas de la transcripción, pueden asegurar el orden temporal correcto de los pasos subsiguientes (O. Calvo y J. Manley, 2001).

Figura 3. Interacción entre los factores de transcripción y poliadenilación durante la transcripción. (A) La transcripción comienza con el reclutamiento y el ensamblaje del PIC en la región promotora de los genes tipo II dependientes de activadores, que van a ser transcritos. PC4, en rojo, facilita el reclutamiento de los factores generales de la transcripción, como TFIID, TFIIB, TFIIA, posiblemente a través de su interacción con TFIIB. (B) En el contexto del PIC, TFIID recluta a CPSF, así mismo CstF se incorpora, posiblemente por su interacción con PC4, la simplequina, o bien, otras subunidades de CPSF. Se piensa que la forma fosforilada de PC4 es la que interactúa con CstF-64 para prevenir la terminación prematura de la transcripción. Posteriormente, se recluta la RNA pol II y otros factores generales como TFIIH (C) que mediante su subunidad denominada Kin28 fosforila el CTD de la RNA pol II, permitiéndolo el inicio de la transcripción (D). Aunque TFIIH/Kin28 se disocia en el PIC otras cinasas, y al menos una fosfatasa denominada Fcp1, van a regular a la RNA pol II durante la elongación. (E) La RNA pol II alarga el pre-mRNA hasta transcribir la señal de poliadenilación, que es reconocida por CstF y CPSF, y con esa acción, PC4 se disocia de CstF activándose de ésta manera la maquinaria de corte y poliadenilación del 3' UTR de los pre-mRNAs (O. Calvo y J. Manley, 2003).



2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Generalidades de *Entamoeba histolytica*.

Se considera al humano como el principal hospedero de *E. histolytica*, éste se contagia vía oral-fecal, ya sea por medio de manos, alimentos y bebidas contaminadas con heces humanas que contienen quistes de éste parásito.

La OMS define a la amibiasis como la condición de portar el parásito protozoario *E. histolytica*, con o sin manifestaciones clínicas. De acuerdo a la sintomatología presentada por los individuos infectados, la amibiasis puede ser clasificada en tres grupos: asintomática, sintomática sin evidencia de invasión tisular y sintomática con evidencia de invasión tisular. *E. histolytica* es un microorganismo eucarionte unicelular que vive generalmente como comensal en el lumen del intestino grueso del hombre, provocando una amibiasis luminal benigna. Sin embargo, bajo ciertas condiciones aún no entendidas del todo, que están correlacionadas con la expresión de genes de virulencia del parásito, éste microorganismo es capaz de invadir la mucosa intestinal y provocar la disentería. Una vez invadido el epitelio intestinal, el parásito puede diseminarse a través de la sangre originando una amibiasis invasiva en donde los trofozoítos son capaces de causar lesiones extraintestinales, principalmente en el hígado y con menos frecuencia en el pulmón, cerebro, piel, órganos genitales, bazo y riñón (A. Martínez-Palomo, 1989).

La amibiasis sintomática es comúnmente una enfermedad intestinal y cuando llega a ser extraintestinal, generalmente involucra al hígado. La amibiasis intestinal se asocia con una amplia gama de alteraciones anatómicas del hospedero, que corresponden a condiciones clínicas bien definidas conocidas como colitis amibiana ulcerativa, megacolon tóxico o disentería amibiana fulminante, granuloma amibiano y apendicitis amibiana.

2.2 Epidemiología de la amibiasis.

E. histolytica presenta una alta incidencia en varias regiones del mundo, convirtiendo a la amibiasis en uno de los problemas más serios de salud a escala mundial y su prevalencia es el resultado de condiciones socioeconómicas precarias, así como estándares de higiene y sanidad deficientes, lo cual es muy frecuente en comunidades de países en vías de desarrollo. La desnutrición dentro de las

poblaciones propicia un estado inmunológico deficiente en los individuos, lo cual constituye un factor de predisposición y riesgo muy importante frente a las infecciones, en especial a aquellas producidas por protozoarios parásitos que habitan en el tracto gastrointestinal, como es *E. histolytica* (A. Martínez-Palomo, 1987; J. I. Ravdin y col., 1988). En algunos países, la amibiasis se coloca entre las diez primeras causas de muerte, siendo la tercera enfermedad parasitaria por protozoarios de mayor importancia en el ámbito mundial, precedida únicamente por la malaria y esquistosomiasis (J. A. Walsh, 1988). Los estudios serológicos usados para estimar la proporción de la población con amibiasis invasora sugieren que sólo uno de cada diez individuos con la infección sintomática presenta invasión de la mucosa intestinal o hepática (J. A. Walsh, 1988). Las áreas geográficas con mayor incidencia de amibiasis son el Sur y Centro de América, Sur y Oeste de África, el lejano Oriente y la India. A nivel mundial se estima que 500 millones de individuos están infectados con *E. histolytica*, de las cuales, 40 millones podrían desarrollar una enfermedad invasiva, causando al año al menos 100000 muertes, muchas de éstas por complicaciones secundarias extra-intestinales, tal como como abscesos hepáticos (M. Sánchez-Guillén y cols., 2002).

En México, la amibiasis es una enfermedad endémica considerada como un serio problema de salud pública ya que se ha estimado que existe una proporción de un paciente con amibiasis invasiva por cada 4 o 5 portadores asintomáticos (B. Sepúlveda, 1982). Se estima que el 20% de la población mexicana total es portadora de *E. histolytica*, de los cuales el 2% presentan síntomas de la enfermedad y entre el 0.1-0.2% de los enfermos muere, esto equivale a 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos sintomáticos y entre 10 a 20 mil muertes (Conde-Bonfil y De la Mora, 1992). En México, Caballero-Salcedo y col, (1994) realizaron un estudio de hemaglutinación indirecta con anticuerpos específicos dirigidos contra *E. histolytica* y encontraron que el 8.4% de la población examinada fue seropositiva, siendo la zona norte del país donde se presento menor incidencia de amibiasis. Los resultados señalan una relación directa entre la frecuencia de amibiasis y los factores socio-económicos tales como el hacinamiento, la carencia de servicios públicos, los malos hábitos higiénicos y el analfabetismo.

2.3 Ciclo de vida de *E. histolytica*.

Su ciclo de vida presenta dos estados morfológicos claramente distinguibles: el quiste y el trofozoíto. El quiste, que es la forma infectiva y propagativa presenta una forma ligeramente ovalada con un diámetro de 8 a 20 μm , cuatro núcleos y una pared celular de quitina de alrededor de 125-150 nm de espesor. Los quistes maduros, los cuales son muy resistentes a cambios ambientales drásticos, al ser ingeridos por el humano se desplazan por el estómago llegando hasta el íleon donde ocurre el desenquistamiento. De cada quiste emergen 8 trofozoítos uninucleados, los cuales se dividen rápidamente por fisión binaria (A. Martínez-Palomo, 1989).

Los trofozoítos dentro del intestino se adhieren a la mucosa intestinal y pueden alojarse como comensales alimentándose de bacterias o de *detritus* celulares provenientes del intestino. La fase activa e invasiva del parásito es el trofozoíto el cual, en contraste con el quiste, es extremadamente sensible al medio ambiente externo y muere rápidamente por desecación. El trofozoíto tiene un diámetro de 10 a 60 μm , posee una gran actividad motora y un pleomorfismo característico por la forma ameboide. El trofozoíto es esencialmente anaerobio, aunque puede crecer en presencia de oxígeno. Los trofozoítos se pueden desprender de la mucosa y en la luz del intestino grueso iniciar nuevamente el proceso de enquistamiento: las células pierden movilidad, toman una forma esférica, se deshidratan y excretan parte de las reservas alimenticias presentes en las vacuolas digestivas, asumiendo la forma de prequiste. Posteriormente, secretan una pared quitina y forman pilas de ribosomas que forman los cuerpos cromidiales, transformándose en quistes uninucleados inmaduros, los cuáles presentan varias divisiones nucleares de manera sucesiva originando quistes maduros tetranucleados, cerrando así el ciclo de vida. Resulta importante resaltar que los individuos infectados de con quistes maduros pueden permanecer como portadores asintomáticos. Sin embargo, mediante mecanismos moleculares aún no caracterizados, los trofozoítos pueden atravesar la mucosa intestinal invadiendo los vasos sanguíneos de los tejidos más próximos, diseminándose hacia los diferentes órganos del cuerpo provocando abscesos, principalmente en el hígado. Este proceso esta determinado por la expresión de algunos genes de virulencia los cuales se expresan a bajos niveles en condiciones normales o cuando los trofozoítos se crecen en condiciones de laboratorio. En la **Figura 4** se muestra un esquema del ciclo de vida del parásito *E. histolytica*.

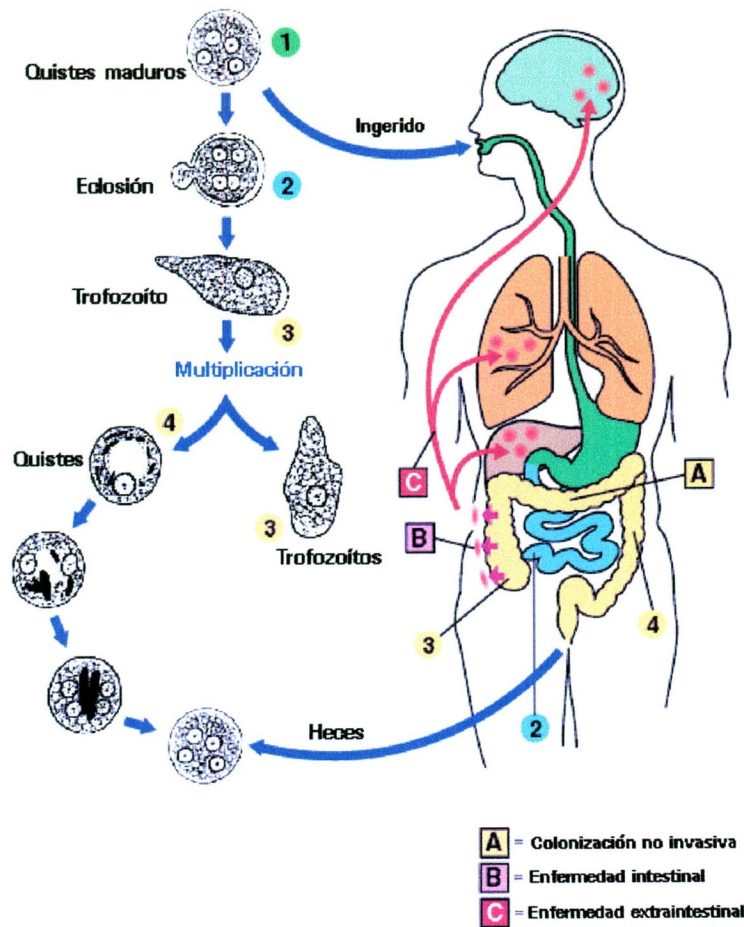


Figura 4. Ciclo de vida del parásito *E. histolytica*. La infección se inicia con la ingesta de quistes maduros (1) provenientes de agua o alimentos contaminados con heces, los cuáles migran a través del tracto digestivo y son capaces de resistir el pH gástrico. En el intestino delgado ocurre la eclosión (2), que consiste en la división del quiste tetranucleado dando origen a ocho núcleos y la posterior liberación de ocho trofozoítos (3). Los trofozoítos se dirigen al intestino grueso para colonizarlo en donde comúnmente son comensales inofensivos alimentándose de bacterias y restos celulares (A), o produciendo los síntomas característicos de la amibiasis intestinal (B) en su hospedero. Finalmente, los trofozoítos se pueden enquistar nuevamente completando el ciclo (4). Bajo ciertas condiciones, los trofozoítos salen del intestino e invaden otros órganos del hospedero como son el hígado, pulmón, cerebro y genitales, produciendo la amibiasis extraintestinal (C) (tomado de: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm).

2.4 Taxonomía y filogenia de *E. histolytica*.

Tradicionalmente, las relaciones filogenéticas entre los eucariontes han sido inferidas usando información morfológica. Desde hace mucho tiempo, *E. histolytica* es considerado como un ejemplo clásico de un eucarionte primitivo debido a su aparente falta de estructuras celulares típicas de un eucarionte tal como mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (M. van der Giezen y cols., 2004). La visión que se tenía de un amitocondriado primitivo cambia con el descubrimiento de genes que codifican para proteínas mitocondriales; por ejemplo, chaperonina 60, Hsp 70 mitocondrial, PNT, y por la demostración de mitosomas (organelos remanentes de mitocondrias) que han sido retenidos en este organismo (M. van der Giezen, S. Cox y J. Tovar, 2004).

El estudio de la filogenia del genero *Entamoeba* ha sido controversial y a la vez interesante debido al lugar que ocupa en la escala evolutiva. En los primeros estudios de filogenia molecular realizados en *E. histolytica*, se compararon secuencias codificantes de la subunidad pequeña del RNA ribosomal, debido a que se considera que estas secuencias nucleotídicas se encuentran en todos los organismos y a que han presentado una tasa de cambio muy lenta durante la evolución de las especies. Los resultados han colocado a *E. histolytica* como un linaje que divergió entre los primeros eucariontes, situándola dentro de los organismos amitocondriados (M. L. Sogin, 1989; M. Hasegawa y col, 1993). Otro estudio que apoya esta idea es el reportado por C. Graham Clark (1999) que se basa en las secuencias de la chaperonina cpn60 (una proteína de origen mitocondrial) en diversos eucariontes y GroEL, su homólogo en procariontes (Figura 5). Contrario a éstos datos, M. Hasewaga y col. (1993) predicen un árbol filogenético utilizando la secuencia de aminoácidos del factor EF-1 α debido a su ocurrencia universal en todos los organismos vivos (en procariontes es denominado EF-Tu) y a su lenta tasa evolutiva. Ellos reportan que *E. histolytica* divergió de la línea principal hacia el tronco de los primeros eucariontes mitocondriados antes de que se separaran en varios reinos. Esto sugiere que *E. histolytica* es una reliquia viviente de la fase temprana de la evolución de los eucariontes, que ocurrió antes de que la simbiosis de la promitocondria emergiera.

Así mismo, se ha sugerido que *E. histolytica* pertenece a un linaje que, junto con otros flagelados, divergió muy temprano dentro de la evolución de los eucariontes,

solamente es precedida por *Microsporidia*, *Trichomonas* y *Giardia*. En otro estudio, Bakker-Grunwald y Wostman (1993), basados en la estructura, el metabolismo, así como en la organización del DNA y RNA, sugieren que *E. histolytica* al igual que *Giardia*, es probablemente uno de los eucariontes más primitivos que existen, por lo que se le considera un protoeucarionte.

Clark C. G. y Diamond, L. S. (1997), utilizaron *riboprints* y construyeron un árbol filogenético con la finalidad de comparar distancias genéticas para el género *Entamoeba*. Sus datos muestran que *E. histolytica* se encuentra más relacionada con *E. dispar* y *E. moshkovskii* que con *E. coli* y *E. invadens*.

Varios autores concuerdan en que *E. histolytica* pertenece a los llamados *Rhizopodos*, pues presentan pseudópodos por lo menos en uno de los estadios de su ciclo de vida (J. O. Corliss, 1987) y a los *Entamoebidae*, cuyos miembros son parásitos. En la **Tabla I** se muestra la clasificación taxonómica de *E. histolytica*. Los organismos pertenecientes al reino Protista, subreino Protozoo, se caracterizan por ser eucariontes unicelulares, móviles y generalmente con nutrición heterótrofa, muchos de ellos parásitos de mamíferos incluyendo a la especie humana. Los que son parásitos de humano se han clasificado en 4 *phylum* en base a sus características nucleares, de reproducción y locomoción, uno de los cuáles es el Sarcomastigophora, que a su vez se ha dividido principalmente en el *subphylum* Sarcodina y Mastigophora. En el *subphylum* sarcodina se agrupan los protozoarios que presentan pseudópodos, los cuáles son proyecciones del citoplasma, que sirven como forma de locomoción y alimentación. El orden Amoebida incluye a los protozoarios que no presentan flagelos durante su ciclo de vida. Los integrantes de la familia *Entamoebidae* presentan un cariosoma en el núcleo, son parásitos del tracto digestivo, y por lo tanto, anaeróbios, los diferentes géneros de ésta familia se diferencian por la morfología del núcleo. El género *Entamoeba* presenta un cariosoma pequeño más o menos central y gránulos de cromatina debajo de la membrana nuclear. La especie *histolytica* es patógena de humanos, invasiva y hematófaga.

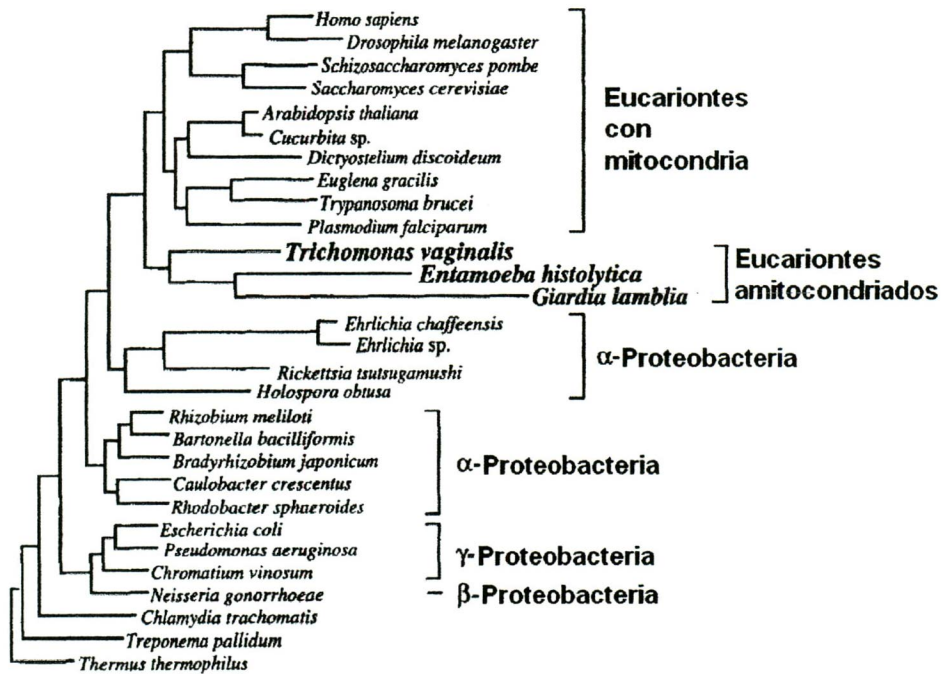


Figura 5. Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de cpn60. Árbol basado en el método de Máxima Verosimilitud que refleja las relaciones entre las chaperoninas eucariontes cpn60 y su homólogo GroEL en bacterias (C. Graham Clark, 1999).

Reino	Protista
Subreino	Protozoo
<i>Phylum</i>	Sarcomastigophora
<i>Subphylum</i>	Sarcodina
Clase	Lobosea
Orden	Amoebida
Familia	Entamoebidae
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>histolytica</i>

Tabla I. Clasificación taxonómica de *E. histolytica*.

2.5 El genoma de *E. histolytica*.

Uno de los primeros genomas de protistas en ser secuenciado fue el de *E. histolytica*. El proyecto inició en el año 2000, y en el 2005 B. Loftus y cols. publicaron el primer borrador del genoma completo de éste microorganismo. Para la secuenciación se empleó el método de "Shotgun" y se deriva de la cepa HM-1:IMSS, debido a que la mayoría de los datos existentes hasta antes del proyecto derivaban de esta cepa. Su cultivo se estableció en 1967 a partir de una biopsia rectal de un hombre mexicano con disentería humana, desde entonces, la cepa ha sido ampliamente empleada para estudios de virulencia, inmunología, biología celular, bioquímica, genética, etc. Actualmente, existen 2 bases de datos del genoma de *E. histolytica* (TIGR y Pathema) donde la calidad de las anotaciones es similar a la de otros organismos como *Drosophila* y humano (C. G. Clark y cols., 2007).

Se ha tratado de hacer una estimación del tamaño del genoma por diferentes métodos y ha sido complicado, debido a las inherentes complejidades de éste microorganismo. A diferencia de muchos eucariontes, las células de *E. histolytica* pueden duplicar su genoma varias veces antes de que la división celular ocurra, y como consecuencia, aproximadamente entre el 5-20 % de los trofozoítos en cultivos axénicos (dependiendo de la fase de crecimiento) son multinucleados. Además, puede presentarse duplicación del DNA en ausencia de división nuclear, lo que provoca que un solo núcleo pueda presentar un contenido genómico 1X a 6X, incluso más. Por tales razones, los cultivos de trofozoítos presentan una heterogeneidad en su contenido genómico. Aparte de los cromosomas lineares, *E. histolytica* presenta varias moléculas de DNA circular tipo plásmidos (Bhattacharya y cols., 2000). En este sentido, se ha estimado que las células de *E. histolytica* presentan una posible ploidía de 4, y que su genoma está constituido por aproximadamente 23.7 millones de pares de bases, distribuidos en 14 cromosomas de tamaño variable que van de 0.3 a 2.2 millones de pares de bases.

El genoma de *E. histolytica* presenta un bajo contenido en GC (24.1 %). La anotación de las regiones codificantes para proteínas fueron inferidas mediante dos aproximaciones (GlimmerHMM y Pat) y se estimó que alrededor del 49.2 % del DNA es codificante. Las funciones de los genes han sido generadas automáticamente por homología. Se han predicho aproximadamente 9938 genes que codifican para

proteínas, esto representa 2 veces más que *P. falciparum* y *S. cerevisiae*, pero muy cercano al del protista de vida libre *D. discoideum* (12500). El número de genes en *E. histolytica* es relativamente grande cuando se compara con otros organismos parásitos, lo que refleja una relativa complejidad a pesar de la pérdida de ciertos genes, esto último es más evidente cuando se han hecho reconstrucciones de las rutas metabólicas, que muestran un consistente patrón de pérdida de la capacidad sintética como consecuencia de su vida parasitaria en un ambiente rico en nutrientes (C. G. Clark y cols., 2007).

Se ha estimado que la longitud promedio de los genes es sorprendentemente pequeño (1167 pb), cuando se comparan con el promedio de las proteínas de *D. discoideum* y *P. falciparum*. El 25.2 % presentan intrones (la mayoría solo 1 exón).

El proyecto del genoma para otras especies de *Entamoeba* está en camino, como es *E. dispar*, la especie hermana de *E. histolytica* que infecta al humano sin causarle síntomas y *E. invadens* que es un parásito reptiliano que causa enfermedad invasiva, principalmente en serpientes y lagartijas. La información obtenida de *E. dispar* puede ser empleada para identificar secuencias vinculadas a virulencia, y la de *E. invadens* para estudiar los patrones de expresión génica durante el enquistamiento.

2.6 Transcripción en *E. histolytica*.

Con la finalidad de entender cómo se regula la transcripción en *E. histolytica*, en el 2004 G. Ramakrishnan y cols. analizaron su genoma para examinar si éste parásito presenta factores conservados que lleven a cabo la acetilación y desacetilación de las histonas. Ellos encontraron representantes únicos de las principales familias de acetilasas de histonas GNAT y MYST, que les denominaron EhGCN5 y EhMYST, respectivamente; así como, un representante de las deacetilasas de histonas, EhHDAC. Dichos factores podrían ser reclutados en sitios específicos de la cromatina y promover la acetilación y desacetilación de las histonas, regulando de ésta manera la expresión global de genes en éste parásito.

O. Fisher y cols. ene. 2004 identificaron y caracterizaron un gen que codifica para una DNA metiltransferasa (EhmetH), la cuál proponen que podría estar modificando epigenéticamente el DNA, afectando la transcripción de genes específicos y la conformación de la cromatina.

Son pocos los factores que constituyen las maquinarias de transcripción y procesamiento del pre-mRNA en *E. histolytica* que han sido clonados y caracterizados. Ejemplo de estos son las proteínas URE3-BP, EhEBP1 y EhEBP2, las cuáles regulan la expresión de los genes *fdx* y *hgl5* (C. A. Gilchrist y cols., 2001; J. M. Schaeenman y cols., 2001) y una proteína tipo EhC/EBP que está involucrada en la activación del gen *EhPgp1* (L. Marchat y cols., 2002). Además, *Ehtbp* y *Ehp53* (L. Mendoza y cols., 2003) que han sido caracterizados como los ortólogos de *tbp* y *p53* en mamíferos, respectivamente. La proteína de unión a la caja TATA de *E. histolytica* es el único miembro de la maquinaria basal de transcripción clonado y caracterizado hasta éste momento (G. Dios-Bravo, 2005).

El core del promotor de *E. histolytica* presenta una inusual estructura tripartita, que consiste de los elementos conservados TATA, GAAC e INR. La enzima RNA pol II de *E. histolytica* es α -amanitina resistente y se ha observado que su CTD carece de los repetidos del heptapéptido (característicos en RNA pol II de mamíferos); sin embargo, presenta una secuencia rica en prolinas y serinas (40 %) y es altamente fosforilado (en 24 serinas, 6 treoninas y 3 tirosinas) y se han identificado otros posibles sitios de fosforilación (9 serinas, 3 treoninas y 1 tirosina). Por lo tanto, pesar de ésta diferencia, es posible que varias cinasas y fosfatasa del CTD modulen las interacciones proteína-proteína, como se postula para otras polimerasas. A la fecha, se han identificado solo 10 subunidades de la RNA pol II en éste protozooario, no se han encontrado homólogos de la subunidad 4 y 12, presentes en *S. cerevisiae* (C.G. Clark y cols., 2007).

Sólo 6 de las 14 subunidades de TFIID evolutivamente conservadas en eucariontes han sido identificadas y se han encontrado homólogos de algunos otros factores generales de la transcripción como son TFIIE, TFIIIF y TFIIH. Se ha observado que aparte de TBP de *E. histolytica*, otras 2 proteínas presentan motivos de unión a la caja TATA.

De manera similar a *G. intestinalis*, *E. histolytica* presenta regiones 5' no traducidas cortas y se ha demostrado su capacidad de ser modificadas por la maquinaria de "capping". Se han identificado homólogos de la enzima RNA guanilil transferasa (enzima que adiciona el cap sin metilar a los nuevos transcritos) y de la metilasa del cap, se ha propuesto que dichas enzimas interactúan con el CTD fosforilado de la RNA pol II en este organismo. Así mismo, se han identificado homólogos de ~80 % de la maquinaria de "splicing" de *S. cerevisiae* (C.G. Clark y cols., 2007).

2.7 Maquinaria de corte y poliadenilación de *E. histolytica*.

En cuanto a los factores que participan en la regulación post-transcripcional de genes en *E. histolytica*, nuestro grupo de trabajo reportó un análisis comparativo *in silico* de secuencias y factores hipotéticos que podrían participar en el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA de *E. histolytica*, comparándolos con los conocidos en *H. sapiens* y *S. cerevisiae*. Este análisis mostró que existían ciertas similitudes y diferencias entre las posibles señales del procesamiento. A diferencia del humano y levadura que presentan 3 secuencias importantes representadas por la señal de poliadenilación que generalmente es el hexanucleótido AAUAAA, el elemento rico en U/GU río-abajo de la señal de poliadenilación y el sitio de corte endonucleotídico constituido por el dinucleótido CA, En *E. histolytica* se encontraron 2 regiones ricas en U, una localizada entre el nucleótido 1-30 río arriba del sitio de poliadenilación y otro entre los nt 3-30 río abajo del sitio de poliadenilación; un motivo rico en U similar al de mamíferos y levadura. Notablemente la señal de poliadenilación UA(A/U)UUU y el sitio de corte no presentan una secuencia consenso similar a la de humano y levadura. En este mismo trabajo, se reportaron factores hipotéticos del procesamiento del 3' pre-mRNA altamente conservados en *E. histolytica*, con alta similitud e identidad a los de humano y levadura. Así mismo, se observó que *E. histolytica* contiene algunos factores homólogos a humano, pero no con levadura, y viceversa, lo que permitió sugerir que la maquinaria del procesamiento del 3' de *E. histolytica* podía representar un estado evolutivo intermediario entre las maquinarias de estos otros dos organismos. En la **Figura 6** se muestra un modelo hipotético de la maquinaria de procesamiento del extremo 3' del mRNA en *E. histolytica* (C. López-Camarillo y cols., 2005).

También, recientemente se ha caracterizado la proteína poli(A) polimerasa EhPAP de *E. histolytica* (J. García-Vivas y cols., 2005), y el factor de corte de 25 kDa EhCFI-25 (J. Fernández, 2007). En este trabajo nos enfocaremos a la caracterización del posible factor de transcripción y de corte/poliadenilación EhPC4.

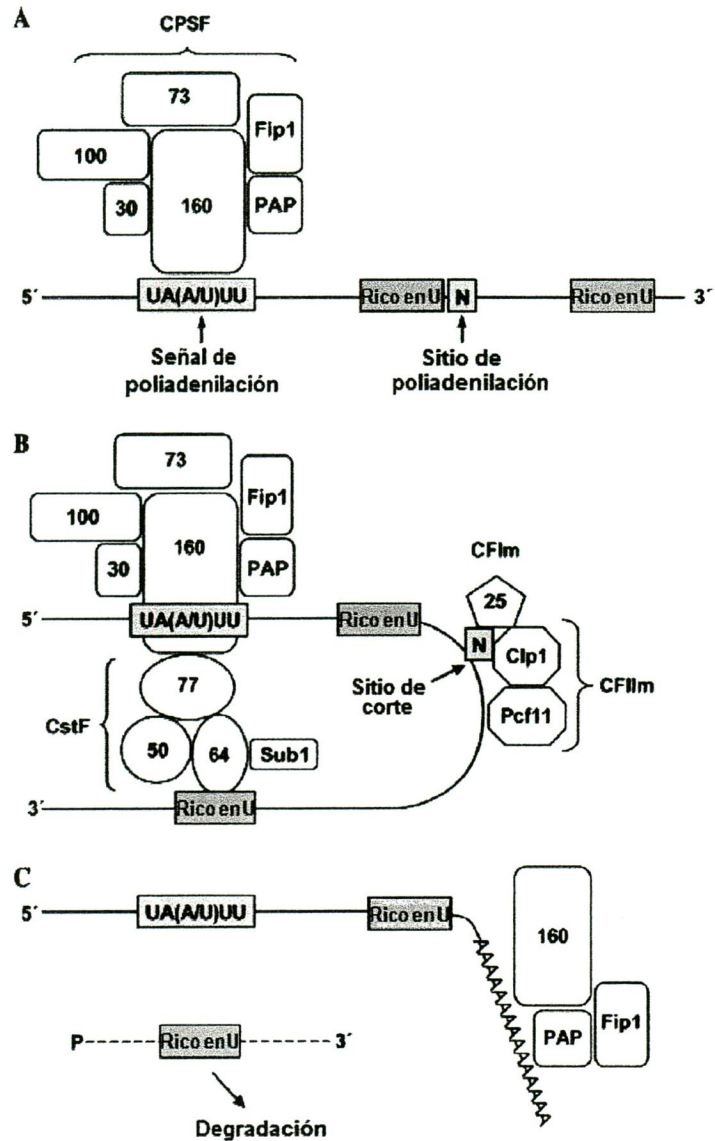


Figura 6. Modelo hipotético de la maquinaria de procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA en *E. histolytica*. (A) El complejo de procesamiento puede ensamblarse a través de la unión cooperativa de EhCPSF, EhFIP1 y EhPAP en la señal de poliadenilación UA(A/U)UU. (B) EhCstF puede unirse a la secuencia rica en U río abajo del sitio de poliadenilación. Los factores EhCFIm y EhCFIIm pueden interactuar con el RNA alrededor del sitio de poliadenilación. (C) El pre-mRNA es cortado por los factores EhCFIm y EhCFIIm, EhPAP se une a EhCPSF y sintetiza el tracto de poli(A) (C. López-Camarillo y cols., 2005).

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO.

En el 2005, nuestro grupo de trabajo reportó 16 genes que codifican hipotéticamente para los factores que conforman la maquinaria de corte y poliadenilación del 3´ pre-mRNA en *E. histolytica*. Entre éstos, se identificó un posible homólogo a PC4 de humano (Sub1 en levadura), esto en base a su altos porcentajes de similitud e identidad (Figura 6, C. López-Camarillo y cols., 2005).

J. Santi-Roca y cols. en el 2007 analizaron los patrones generales de expresión de 1130 genes de trofozoítos de la cepa HMI:IMSS de *E. histolytica* mediante un microarreglo de oligonucleótidos. Compararon la expresión de los mRNAs de parásitos virulentos obtenidos a partir de abscesos de hígado de hámster con trofozoítos no virulentos, los cuáles habían perdido la capacidad para desarrollar abscesos debido a que fueron cultivados axenicamente por más de 3 años. Se observó que los parásitos virulentos presentaban 21 genes que disminuían dos veces su expresión y 29 genes que se sobreexpresaban más de dos veces. Entre éstos, identificaron dos genes bajo condiciones de virulencia, XM_652289 y XM_648786, que incrementaron 2.5 y 2.2 veces su expresión, respectivamente y que codificaban para factores de la transcripción y del procesamiento del RNA. XM_652289 y XM_648786 codifican para los posibles homólogos de humano CstF-64 y PC4, respectivamente (J. Santi-Roca, 2007). La base de datos con los resultados está disponible en la siguiente dirección: <http://genoscript.pasteur.fr>.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO.

E. histolytica es un patógeno de importancia médica en México y en el mundo, sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la expresión de sus genes son poco conocidos, por lo que su estudio es importante.

El conocimiento de *E. histolytica* a nivel molecular nos puede permitir tener una mejor comprensión de los mecanismos y factores involucrados en procesos biológicos tales como el inicio del proceso infeccioso, la invasión y permanencia dentro de su hospedero.

Nuestro grupo de trabajo está trabajando en la caracterización de los componentes de las maquinarias moleculares que participan en el procesamiento del pre-mRNA, específicamente de la maquinaria de poliadenilación en *E. histolytica*, ya que el procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA es un evento determinante en la expresión de genes.

Debido a que EhPC4 es una proteína que posiblemente participa en la transcripción y poliadenilación de los transcritos en *E. histolytica*, su estudio nos ayudará a tener una mejor comprensión de éstos mecanismos y definir su importancia en la expresión de genes, incluyendo aquellos implicados en virulencia de éste parásito.

II. OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

Caracterizar el posible factor de transcripción y de corte/poliadenilación EhPC4 de *Entamoeba histolytica*.

2. Objetivos específicos.

- 1.- Realizar un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.
- 2.- Analizar la expresión del mRNA del gen *Ehpc4* en trofozoítos de *E. histolytica* con diferentes grados de virulencia.
- 3.- Clonar el gen *Ehpc4* en el vector de expresión pRSET-A.
- 4.- Expresar y purificar la proteína recombinante rEhPC4.
- 5.- Generar anticuerpos policlonales específicos para la proteína EhPC4.
- 6.- Determinar la localización subcelular de la proteína EhPC4 en trofozoítos de *E. histolytica*.
- 7.- Analizar la interacción de la proteína rEhPC4 con una secuencia de dsDNA.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para cumplir con los objetivos planteados en éste trabajo, seguimos la estrategia experimental que se presenta en la Figura 7.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.

1.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4 en las bases de datos del genoma de *E. histolytica*.

Para determinar si el genoma de *E. histolytica* contiene genes que codifiquen para una o más proteínas con un porcentaje de similitud e identidad estadísticamente significativo, que sugirieran homología con PC4 de humano, se realizó un alineamiento local mediante el algoritmo computacional BLAST (Basic Local Alignment search Tool) en las bases de datos del genoma de *E. histolytica* TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/eha1/>) y Pathema (<http://pathema.jcvi.org/tigrscripts/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>). Empleamos como sonda la secuencia de aminoácidos completa de PC4 de *H. sapiens*, la cual obtuvimos de la base de datos del NCBI, por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que es un banco que contiene secuencias de aminoácidos de proteínas en diversos organismos. En la **Tabla II** se muestran las características de dicha secuencia.

1.2. Búsqueda de ortólogos de EhPC4 mediante BLAST.

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína EhPC4 (No. de acceso en TIGR, 69.m00181), fue empleada como sonda para hacer una búsqueda de secuencias ortólogas, es decir homólogas en diferentes organismos. Con éste fin, realizamos un BLAST que permite la identificación de secuencias con regiones idénticas y similares a las de EhPC4 en el servidor EXPASy (por sus siglas en inglés, “Expert Protein Análisis System”) en todas las bases de datos para todos los grupos taxonómicos (<http://www.expasy.org>).

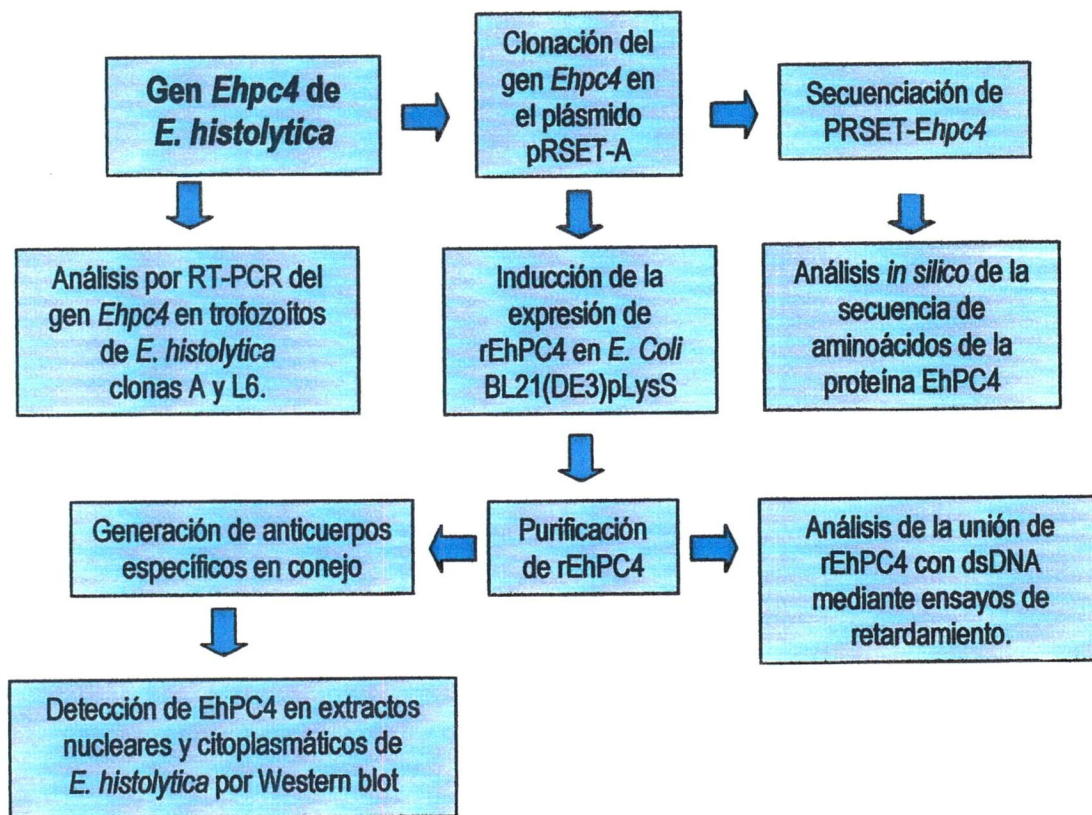


Figura 7. Estrategia experimental. Analizamos la expresión del gen *Ehpc4* de *E. histolytica* en trofozoítos HMI:IMSS clonas A y L6. Se clonó el gen completo *Ehpc4* en el vector de expresión pRSET-A y se secuenció. Realizamos un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4 que obtuvimos a partir de los datos de secuenciación del gen *Ehpc4* clonado pRSET-A. El plásmido recombinante pRSET-*Ehpc4* se empleó para la transformación de bacterias *E. coli* BL21(DE3)pLysS para inducir la expresión de la proteína recombinante rEhPC4, la cuál posteriormente fué purificada por cromatografía con una columna de afinidad. La proteína rEhPC4 purificada fue empleada para la inmunización de un conejo y generar anticuerpos policlonales específicos. Los anticuerpos fueron utilizados para la detección de la proteína EhPC4 en extractos citoplasmáticos y nucleares de trofozoítos de *E. histolytica* HM1:IMSS. Así mismo, la proteína rEhPC4 fue empleada para analizar su interacción con dsDNA mediante ensayos de retardamiento.

Proteína	Organismo	Número de acceso (NCBI)	Función	Longitud (aa)	Peso (KDa)	Secuencia de aa
PC4	<i>H. sapiens</i>	P53999	Coactivador transcripcional de la RNA pol II	127	15	MMMPKSKELVSS SSSGSDSDSEVDKK LKRKKQVAPEKPVK KQKTGETSRALSSSK QSSSRDDNMFQIG KMRYVSVRDFKGV LIDIREYWMDPEGEM KPGRKGISLNPEQW SQLKEQISDIDDAVR KL

Tabla II. Características de PC4 de *H. sapiens*. La secuencia de aminoácidos de PC4 de *H. sapiens* con número de acceso P53999 fué empleada como sonda para la búsqueda de un homólogo en la base de datos del genoma de *E. histolytica*. La proteína que funciona como un coactivador transcripcional de la RNA pol II está constituida por 127 residuos de aa, lo que corresponden a 15 kDa.

1.3 Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de EhPC4 y sus ortólogos.

El análisis y comparación de la secuencia de aminoácidos de EhPC4 con las de sus proteínas ortólogas, se realizó mediante un alineamiento múltiple con el programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). El alineamiento se obtuvo en un archivo con formato ALN y se sometió al programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_doc.html) para facilitar el análisis de regiones conservadas entre las secuencias. Los organismos de los cuáles incluimos secuencias fueron: *Entamoeba histolytica* (Eh), *Tetrahymena thermophila* (Tt), *Dictyostelium discoideum* (Dd), *Brachidario rerio* (Br), *Homo sapiens* (Hs), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Xenopus laevis* (Xl), *Gallus gallus* (Gg), *Rattus norvegicus* (Rn), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At), *Caenorhabditis elegans* (Ce) y *Trichomonas vaginalis* (Tv).

1.4 Análisis filogenético de la proteína EhPC4 y sus ortólogos.

El árbol evolutivo o hipótesis filogenética entre la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4 y sus ortólogas, se contruyó sometiendo el alineamiento múltiple de las secuencias (sección 1.3) al programa MEGA, por sus siglas en inglés *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (<http://www.megasoftware.net/>), versión 4.0 (K. Tamura y cols., 2007). El método empleado fue el de Neighbor joining (NJ) que se basa en el cálculo de distancias. La robustez de la predicción fue apoyada mediante *Bootstrap* con 1000 réplicas.

1.5 Búsqueda de dominios funcionales y estructurales de EhPC4.

La predicción de los posibles dominios funcionales de la proteína EhPC4, se realizó sometiendo la secuencia completa de aminoácidos a la base de datos InterPro-Scan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan>) y pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>), las cuales contiene información de dominios de proteínas. Para predecir los posibles motivos estructurales de la proteína EhPC4, hicimos una búsqueda mediante BLASTP en la base de datos de MOTIF SCAN (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan>).

1.6 Determinación de la estructura secundaria y terciaria de EhPC4.

La predicción de la estructura secundaria de la proteína EhPC4 se realizó en la base de datos del programa PBIL (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>), el cuál hace uso de diferentes algoritmos para sus predicciones y calcula una estructura consenso. Posteriormente, comparamos la predicción consenso obtenida *in silico* con la estructura secundaria reportada anteriormente para PC4 de humano (Werten, R. y cols., 1999).

La predicción de la estructura terciaria de las proteínas PC4 y EhPC4 se realizó empleando el programa Swiss Model (<http://expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Para la reconstrucción de las estructuras en tres dimensiones se empleó el visualizador Pymol versión 1.0 (<http://pymol.sourceforge.net>).

1.7 Determinación de las modificaciones postraduccionales de EhPC4.

La predicción de las posibles modificaciones de la secuencia de la proteína EhPC4 se realizó utilizando el programa MOTIF SCAN (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan>).

2. Análisis de la expresión del mRNA del gen *Ehpc4* por RT-PCR en trofozoítos de las clonas A y L6 de *E. histolytica*.

2.1. Cultivos de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los trofozoítos de la clona A virulenta y L6 no virulenta de *E. histolytica* HM1:IMSS, fueron mantenidos y crecidos bajo condiciones axénicas a 37 °C en cajas de cultivo con 50 ml de medio completo TYI-S-33 complementado con 15% de suero bovino (Biofluds), 3% de una mezcla de vitaminas de Diamond y los antibióticos penicilina (0.3 U/ml) y estreptomycin (0.25 mg/ml). Las cajas de cultivo de trofozoítos en la fase exponencial de crecimiento, fueron incubadas en hielo durante 10 min para permitir que las células se desprendieran y se resuspendieran en el medio. El cultivo de trofozoítos se pasó a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante para obtener la pastilla celular, la cuál se resuspendió en 5 ml de amortiguador PBS 1X, y nuevamente se centrifugó a 4 °C durante 5 min a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla celular fue empleada inmediatamente para la extracción de RNA total.

2.2. Extracción y cuantificación de RNA total de alta calidad.

A partir de los trofozoítos cultivados en condiciones basales de las clonas A y L6 de *E. histolytica*, se realizó la extracción de RNA total mediante el uso del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen). El proceso de extracción se dividió en 3 etapas: lisis celular, separación del RNA de otros componentes celulares y precipitación del RNA.

La pastilla de trofozoítos (4×10^6 células) se resuspendió en 400 μ l de TRIzol, pipeteando suavemente de 2-3 veces. La suspensión se pasó a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 ml y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la lisis celular. Al lisado celular se le añadieron 300 μ l de cloroformo, el cuál se mezcló por inversión suave del tubo de 3-5 veces y se dejó en reposo durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 4 °C durante 3 min a 12000 rpm. La mezcla de fenol-cloroformo separó la solución de lisis en una fase orgánica de coloración rosada y otra acuosa transparente, separadas por una interfase de color blanco. Dado que la solución de lisis utilizada no permite la disociación de los complejos DNA-proteínas, el DNA permaneció en la fase orgánica junto con las proteínas y gran parte de los carbohidratos, lípidos y restos celulares. El RNA de la fase acuosa se extrajo y se colocó cuidadosamente con una pipeta en un tubo 1.5 ml nuevo, evitando arrastrar los componentes de la interfase y de la fase orgánica. A la fase acuosa se le adicionaron 800 μ l de isopropanol y se mezclaron por inversión suave del tubo, luego se dejó en reposo 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm, el sobrenadante se decantó y nos quedamos con una pastilla blanca correspondiente al RNA puro. La pastilla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación del isopropanol y posteriormente fue resuspendida en 100 μ l de agua DEPC libre de ribonucleasas. El RNA obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación y determinación de la calidad del RNA total extraído se realizó de manera estándar por espectrofotometría. Debido a que el RNA cuando está puro presenta una relación lineal entre concentración y absorbancia a 260 nm ($A_{260\text{nm}}$), su concentración se determinó midiendo su $A_{260\text{nm}}$ en solución. Dado que 1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ de RNA de cadena sencilla corresponde a 44 μ g/ml, la concentración del RNA problema se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{RNA } \mu\text{g/ml}] = (A_{260\text{nm}}) (44) \text{ (factor de dilución del RNA en agua)}$$

La pureza del RNA en solución también se determinó midiendo la relación de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$), si ésta es mayor que 2, entonces se considera puro. Un valor de $A_{260/280}$ entre 1.8-2 indica la presencia de DNA y un valor menor a 1.7 significa contaminación con proteínas y fenol.

Así mismo, la cantidad y calidad del RNA total extraído se determinó mediante la observación del patrón de corrimiento electroforético de las moléculas en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X. En el pozo del gel se cargaron 2 μg de RNA total con amortiguador de carga para RNA que contiene formamida para eliminar las estructuras secundarias en forma de asas y horquillas que pudieran interferir en la correcta migración de las moléculas, y se corrieron a 120 v durante 20 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de rayos UV.

2.3 Diseño y cuantificación de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos en sentido y antisentido generados para amplificar la secuencia completa del gen *Ehpc4* y actina se muestran en la **Tabla III**. Estos fueron diseñados utilizando el programa OLIGO, para lo cual se consideró que la longitud y el valor de T_m de ambos oligos fueran muy cercanos, que sus secuencias no favorezcan la hibridación entre sí, ni la formación de estructuras secundarias estables y que fueran específicos, es decir, que no sean complementarios a otras secuencias presentes en el genoma de *E. histolytica*.

La cuantificación de los oligonucleótidos se realizó mediante su corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X y la tinción con bromuro de etidio para su visualización bajo la exposición a luz UV. Dada la existencia de una relación lineal entre la concentración de los oligonucleótidos en solución y su $A_{260\text{nm}}$, nosotros determinamos la concentración de éstos mediante espectrofotometría. Se ha determinado que 1 unidad de $A_{260\text{nm}}$ de oligonucleótidos de cadena sencilla corresponde a 33 μg , por lo tanto, la concentración puede determinarse bajo la siguiente ecuación:

$$[\text{Oligonucleótidos } \mu\text{g/ml}] = (A_{260\text{nm}}) (33) \text{ (factor de dilución de los oligonucleótidos)}$$

Nombre del oligonucleótido	Longitud (bases)	Secuencia de nucleótidos
<i>Ehpc4</i> - S	27	5´-CCC GGA TCC ATG TCA GAT AAA AAA CCT-3´
<i>Ehpc4</i> - AS	27	5´ -CCC AAG CTT TGC TTA TTT AAT CCA CTT-3´
<i>actina</i> - S	21	5´-AGC TGT TCT TTC ATT ATA TGC- 3´
<i>actina</i> - AS	21	5´-TTC TCT TTC AGC AGT AGT GGT- 3´

Tabla III. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR de los genes *Ehpc4* y *actina*.

2.4 Determinación de la expresión del mRNA del gen *Ehpc4* mediante RT-PCR.

Implementamos la técnica retrotranscripción seguida de la amplificación por PCR en dos pasos con la finalidad de detectar diferencias en la expresión del gen *Ehpc4* en trofozoítos HMI:IMSS de la clona A y L6 de *E. histolytica*, en condiciones basales de cultivo. El protocolo que seguimos se dividió en tres: pretratamiento del RNA total con DNAsa I, la reacción de retrotranscripción para la generación de cDNA, y finalmente la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las secuencias de interés.

2.4.1 Pretratamiento con DNAsa I libre de RNAsa.

Para eliminar el DNA contaminante que pudiera haber quedado en el RNA total después de su extracción, éste fue tratado con la enzima DNAsa I libre de RNAsa. Para ello, 2 µg de RNA total de la clona A y L6 se mezclaron por separado en tubos de PCR con 1 U de DNAsa y 20 U de Rnasin, llevándolo el volumen final de reacción a 10 µl. Se incubaron a 37 °C durante 15 min para permitir que la DNAsa I degrade el DNA presente en el tubo de reacción. Posteriormente, se inactivó la DNAsa I adicionando 1 µl de EDTA 25 mM a cada tubo de reacción e incubándolos a 65 °C durante 15 min. Éste último paso es muy importante debido a que esta mezcla de RNA total se utiliza en los pasos siguientes para la síntesis del cDNA y del amplificado de DNA durante la reacción de PCR.

2.4.2 Retrotranscripción.

Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, es decir, la síntesis de cDNA a partir del RNA total, se siguió el siguiente protocolo. A la mezcla de reacción que fue pretratada con DNAsa I libre de RNAsa se le adicionaron 100 ng de oligo d(T), 1 µl de dNTP's 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 U de RNAsin, 1 µl de DTT 0.2 M y 4 µl de buffer de reacción 5X para la enzima Superscript II™ de Invitrogen (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 1mM). La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionaron 200 U de la enzima Superscript II dependiente de RNA y se llevó la reacción a un volumen final de 20 µl con agua. Se incubó a 42 °C durante 90 min para permitir que la retrotranscriptasa sintetizara el cDNA. Finalmente, se trató la reacción con 1 µl de RNAsa H para eliminar el templado de RNA y optimizar la reacción de PCR, ya que incrementa el número de hebras de cDNA libres que sirven de templado en la reacción de PCR.

2.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la reacción de PCR se utilizaron 4 µl del cDNA, que corresponde a una quinta parte de la reacción final de retrotranscripción. En la **Tabla IV** se muestran los reactivos y las cantidades utilizadas para la reacción de PCR.

En tubos de PCR se mezclaron por separado 4 µl de cDNA de las clonas A y L6, con 1 µl de dNTP's 10 mM, 20 picomoles de cada oligonucleótido en sentido y antisentido específicos para el gen *Ehpc4*, MgCl₂ 2 mM y 5 µl de amortiguador de reacción 10X para la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen). El volumen de la reacción se ajustó a 50 µl con agua. Finalmente, se le adicionó 1 U de enzima Taq DNA polimerasa. Los tubos se incubaron en un termociclador (Thermoline) y se aplicó el programa de amplificación para el gen *Ehpc4* representado en la **Figura 8**. La muestra se sometió a un ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 5 min, luego a 25 ciclos de polimerización y extensión que comprenden 30 s a 94 °C; 35 s a 40 °C; 35 s a 72 °C; y finalmente, a un último ciclo de extensión de 7 min a 94 °C. Como control interno, se amplificaron productos de RT-PCR generados a partir de oligonucleótidos específicos para un fragmento de 222 bases del gen de la *actina* de *E. histolytica*, la cual no varía su expresión en condiciones basales. Las condiciones de amplificación para el gen de *actina* fueron: un ciclo de desnaturalización del DNA a 94 °C durante 5 min, 25 ciclos de polimerización y extensión que comprenden 30 s a 94 °C; 35 s a 50 °C; 35 s a 72 °C y un ciclo final de 7 min a 94 °C.

Cada reacción de RT-PCR, tanto para *Ehpc4* como para *actina*, fue acompañada de una reacción que sirve como control negativo, denominado RT-, que consistió en la reacción de RT-PCR tal cual se explicó anteriormente, excepto que no se le adicionó la enzima retrotranscriptasa, esto con el fin de detectar contaminación por DNA.

2.4.4 Análisis de los productos de PCR mediante geles de poliacrilamida.

Los productos amplificados correspondientes al gen *Ehpc4* y *actina*, así como sus correspondientes controles RT- fueron resueltos mediante PAGE al 12% en amortiguador TBE 1X. El gel posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV. La intensidad de las bandas resultantes se cuantificó mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Multigaue (Fujifilm).

Reactivo	Concentración final
cDNA clona A/L6	4 μ l
Buffer 10X	1X
dNTP´s 10mM	2,5 mM de cada uno
Oligo en sentido <i>Ehpc4/actina</i>	20 picomoles
Oligo en antisentido <i>Ehpc4/actina</i>	20 picomoles
MgCl ₂	2 mM
Taq DNA polimerasa (Gibco)	1 U
Agua	cbp 50 μ l

Tabla IV. Reactivos y sus respectivas concentraciones empleadas para la reacción de PCR para la amplificación de los genes *Ehpc4* y *actina*.

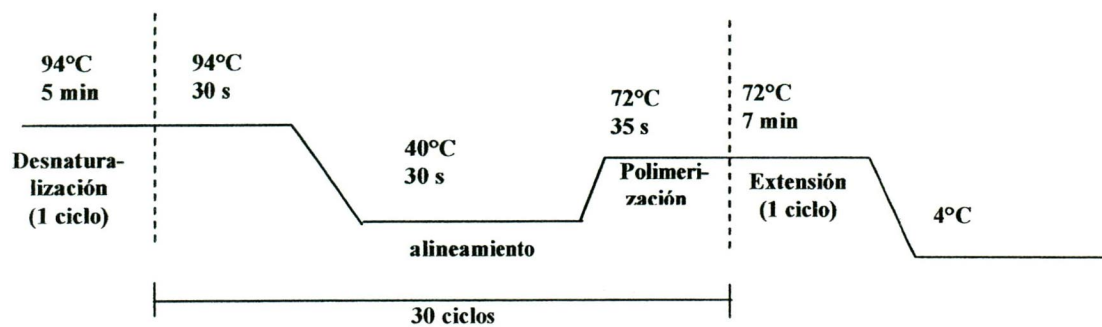


Figura 8. Condiciones de amplificación por PCR empleados para el gen *Ehpc4*.

3. Clonación del gen *Ehpc4* en el vector de expresión pRSET-A.

3.1 Obtención de DNA genómico de trofozoítos de *E. histolytica*.

El DNA genómico se obtuvo a partir de trofozoítos de *E. histolytica* clona A, empleando el “*kit Wizard Genomic DNA purification*” (Promega) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para aislamiento de DNA genómico de cultivos de tejidos y tejidos animales. Un cultivo de 6×10^6 células se centrifugó a 4°C durante 10 min a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1200 μl de una solución de lisis (*Nuclei Lysis Solution*). La suspensión se distribuyó en 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (800 μl en cada uno), a cada tubo se le adicionó 200 μl de una solución para precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) y se incubaron durante 5 min en hielo. Los tubos se centrifugaron a 4°C durante 4 min a 13000 rpm. El sobrenadante se recuperó en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml nuevos y se les adicionaron 600 μl de isopropanol al 100%, mezclando por inversión suave de los tubos. Nuevamente se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de DNA a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 30 μl de agua grado biología molecular (Sigma) y se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría a una $A_{260\text{nm}}$.

3.2 Amplificación por PCR del gen *Ehpc4* a partir de DNA genómico de *E. histolytica*.

El DNA de *E. histolytica* extraído (sección 3.1) se empleó para la amplificación por PCR del gen *Ehpc4*. La mezcla de reacción y el programa de amplificación que empleamos es el mismo al detallado en la sección 2.4.3, la única diferencia es el templado, que en éste caso se utilizaron 100 ng de DNA genómico por reacción de PCR.

3.3 Purificación de los productos amplificados por PCR.

Los productos de amplificación por PCR del gen *Ehpc4* se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X. Para ello, la reacción total de PCR, que correspondía a 50 μl , fue mezclada con 2 μl de un amortiguador de carga para DNA. Las muestras fueron cargadas en los pozos y como patrón de

referencia se empleó el marcador de peso molecular λ HindIII (New England, Biolabs). Las muestras se corrieron a 100 v aproximadamente 30 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los productos resueltos se visualizaron mediante su exposición a luz UV en un transiluminador (BioRad). Se cortaron las bandas del gel de agarosa que correspondían a los amplificadores del gen *Ehpc4* y las moléculas fueron extraídas del gel mediante el uso de "GeneClean II kit" (BIO 101), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas se distribuyeron en tubos de microcentrífuga y se pesaron, después se mezclaron con 3 volúmenes de una solución de NaI 6M y se incubaron a 65 °C por 10 min para disolver la agarosa. Posteriormente, se adicionaron 10 μ l de perlas de sílica a cada tubo, se mezclaron perfectamente y se incubaron toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la muestra se centrifugó durante 1 min a 8500 rpm y se decantó el sobrenadante. Se lavaron las perlas 2 veces resuspendiéndolas en 500 μ l de la solución "New Wash" y centrifugándolas a 4 °C durante 1 min a 8500 rpm. Después del último lavado se desechó el sobrenadante y las pastillas de perlas se secaron incubándolas a 55 °C durante 15 min. Para eluir el DNA de las perlas, se adicionaron 20 μ l de agua de ampolla a cada tubo y se incubaron 15 min a 55 °C. Después, los tubos se centrifugaron durante 1 min a 8500 rpm y se recuperaron los sobrenadantes, que contienen el DNA correspondiente a los productos de PCR del gen *Ehpc4*, en un tubo nuevo de microcentrífuga. La concentración del DNA extraído se determinó en geles de agarosa y por espectrofotometría. El DNA purificado mediante éste método se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.4 Clonación del gen *Ehpc4* en el plásmido pRSET-A.

Como se detalló en las secciones 3.2 y 3.3, obtuvimos el inserto por PCR el cual corresponde al gen completo *Ehpc4* y que en sus extremos presenta secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Hind*III. Para la clonación del inserto en el plásmido pRSET-A, se hicieron reacciones de doble restricción por un lado del inserto y por otro del plásmido con ambas enzimas.

Para la reacción de doble digestión del inserto, se hizo la siguiente mezcla de reacción: 500 ng de inserto, 5 U de cada enzima *Bam*HI y *Hind*III (New England, Biolabs), 10 μ g de BSA y 2 μ l de amortiguador de restricción No. 2 (New England, Biolabs), la reacción se llevó a 24 μ l con agua desionizada estéril. Para la reacción de doble digestión del plásmido pRSET-A, se mezclaron 600 ng del plásmido, 5U de cada

enzima *Bam*HI y *Hind*III, 10 µg de BSA, 2 µl de amortiguador de restricción No. 2, la reacción se llevó a 20 µl con agua desionizada estéril. Las mezclas de reacción se incubaron durante toda la noche a 37 °C para permitir que las enzimas generen extremos cohesivos en el inserto y el vector.

Al siguiente día, los productos de reacción se cargaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1X, como patrón de referencia de tamaño molecular se empleó el marcador de DNA λ *Hind*III (New England, Biolabs), se resolvieron a 100 v, aproximadamente 30 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados a través de un transiluminador de UV. Las bandas que correspondían al plásmido e inserto digeridos se cortaron del gel y se purificaron con el “*GeneClean II kit*” (BIO 101), tal como se detalló en la sección 3.3.

El inserto y el plásmido digeridos y purificados fueron cuantificados en gel y por espectrofotometría, y se emplearon para hacer diferentes reacciones de ligación en proporción 1:3 y 1:5 de vector/inserto. Como control interno, se preparó una reacción de ligación del plásmido pRSET-A cortado, pero sin inserto. Las mezclas fueron incubadas durante toda la noche a 16 °C. Los productos de las reacciones de ligación fueron empleados para transformar células *E. coli* DH5 α competentes.

3.5 Preparación de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α por el método CaCl₂.

Se seleccionó una colonia de células *E. coli* DH5 α la cual fue inoculada en 2 ml de medio LB líquido y crecida hasta su saturación durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Al día siguiente, se tomaron 100 µl de éste precultivo y se inocularon 50 ml de medio LB líquido. Las bacterias se crecieron a 37 °C y 230 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O) entre 0.4-0.6 a A_{595nm}. Las células se cosecharon en un tubo cónico y se centrifugaron a 4 °C durante 3 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 20 ml de una solución de CaCl₂ 100 mM estéril. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo. Nuevamente se centrifugó a 4 °C durante 3 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 4 ml de la solución de CaCl₂ 100 mM estéril. Siguiendo éste protocolo se obtuvieron células competentes, las cuales se almacenaron no más de una semana a 4 °C, hasta su uso.

3.6 Transformación de células competentes *E. coli* DH5 α por choque térmico.

La transformación de células competentes *E. coli* DH5 α se realizó mediante la técnica de choque térmico. Para esto, en tres tubos de microcentrífuga de 1.5 ml se colocaron 200 μ l de células competentes *E. coli* DH5 α en hielo (sección 3.5) y a cada tubo se le adicionó una de las tres reacciones de ligación vector-inserto (sección 3.4). Los tubos se incubaron durante 30 min en hielo, luego las células fueron sometidas a un choque térmico de 42 °C durante 90 s. Inmediatamente se incubaron en hielo durante 3 min y se le adicionó a cada tubo 200 μ l de medio LB líquido estéril. El cultivo se dejó en agitación durante 45 min a 37 °C para permitir la recuperación de las células sometidas a choque y la expresión del fenotipo resistente a ampicilina que se manifiesta en las células que han adquirido el plásmido. Todo el cultivo se espatuló en placas con medio sólido LB con ampicilina 50 μ g/ml para seleccionar a las transformantes resistentes a ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se hizo una selección de las clonas candidatas y se realizó una minipreparación de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina, para verificar la presencia del plásmido pRSET-*Ehpc4*.

3.7 Aislamiento del plásmido pRSET-*Ehpc4* mediante lisis alcalina.

Para la obtención de DNA plasmídico de las clonas candidatas (sección 3.6) se siguió la técnica descrita por Sambrook y col., en 1989. Las clonas seleccionadas después de la transformación se sembraron por separado en 5 ml de medio LB con 50 μ g/ml de ampicilina y se crecieron hasta la saturación del cultivo, durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al siguiente día, se tomaron 1.5 ml de cada cultivo y se colocaron en un tubo de microcentrífuga, se empastillaron las células centrifugándolas a 4 °C durante 5 min a 5000 rpm. Desechamos el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min, después se resuspendieron en 100 μ l de la solución I fría (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó a cada tubo 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezclaron por inversión suave, después se incubaron en hielo por 5 min. Se agregaron 150 μ l de solución III (acetato de potasio 5M) mezclando suavemente por inversión de los tubos y se incubaron durante 5 min en hielo. La muestra fue centrifugada a 4 °C durante 10 min a 8500 rpm para empastillar los detritos y el DNA genómico. Los sobrenadantes se recuperaron

en tubos nuevos de microcentrífuga, se les adicionó a cada uno 800 μ l de etanol frío al 100% y se incubaron 5 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla se centrifugó nuevamente durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar todo el etanol. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 μ l de agua desionizada estéril.

3.8 Análisis del plásmido pRSET-*Ehpc4* mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

Los plásmidos obtenidos por lisis alcalina (sección 3.7) se analizaron por restricción con las endonucleasas *Bam*H1 y *Hind*III para determinar la presencia del gen *Ehpc4* en el plásmido pRSET. En tubos de microcentrífuga se colocaron por separado 1 μ g de plásmido de cada una de las clonas candidatas, 2 μ l del amortiguador de restricción 10X No. 2 (New England), 1 U de cada una de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (New England), 10 μ g de BSA, la reacción se llevó a 20 μ l con agua bidestilada estéril. Los tubos se incubaron durante 4 h a 37 °C para favorecer la reacción. Los productos de las reacciones de restricción fueron resueltos y analizados en geles de agarosa 1% en TBE 1X para verificar la presencia y el tamaño del inserto. Como patrón de referencia de tamaño molecular se empleó el marcador λ *Hind*III (New England, Biolabs).

3.9 Análisis del plásmido pRSET-*Ehpc4* mediante PCR.

La presencia del gen *Ehpc4* en los plásmidos candidatos (sección 3.7) también se verificó mediante una reacción de PCR. La reacción y las condiciones de amplificación fueron similares a las descritas en la sección 2.4.3. Para ello, se emplearon como templado 100 ng del plásmido obtenido a partir de la minipreparación por lisis alcalina, 1 μ l de dNTP's 10 mM, 20 picomoles de cada oligonucleótido en sentido y antisentido para el gen *Ehpc4*, MgCl₂ 2 mM, 5 μ l del amortiguador 10X para la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 U de enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen), todo esto ajustado con agua a un volumen final de 50 μ l. Se realizaron 25 ciclos de amplificación a 94 °C, 30 s; 40 °C, 35 s; 72 °C, 35 s, seguidos de una extensión a 72 °C durante 7 min. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE1X. El gel posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante su exposición a luz UV.

3.10 Expansión y purificación del plásmido pRSET-*Ehpc4*.

Se eligió uno de los plásmidos candidatos al cuál se le corroboró la presencia del gen *Ehpc4* por restricción y PCR, y lo expandimos para su uso en posteriores ensayos. Para esto, se transformaron con 100 ng de plásmido células competentes *E. coli* DH5 α (secciones 3.5 y 3.6). Posteriormente, se hizo un precultivo de 2 ml a partir de una colonia transformante en medio LB líquido con ampicilina 50 ng/ml. Se tomaron 100 μ l del precultivo y se inocularon en 100 ml de medio LB líquido con ampicilina, las bacterias se crecieron a 37 °C en agitación a 230 rpm toda la noche hasta saturación. Posteriormente se recuperaron por centrifugación a 4 °C durante 3 min a 5000 rpm. La lisis celular, la extracción y purificación del plásmido fue hecha mediante el uso del kit comercial "QIAfilter midi" (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante por éste método fue resuspendido en 500 μ l de agua estéril y se alicuotó para almacenarlo a -20 °C, hasta su uso.

3.11 Cuantificación del plásmido pRSET-*Ehpc4* por espectrofotometría.

La cuantificación del plásmido purificado se realizó por espectrofotometría. Para esto, hicimos una dilución del plásmido 1:500 en agua estéril y se midió su absorbancia a 260/280nm ($A_{260/280nm}$). Ya que existe una relación lineal entre la $A_{260/280nm}$ y la concentración de DNA plasmídico (1 D.O = 50 μ g de plásmido) en solución, la concentración del plásmido se estimó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{DNA plasmídico } \mu\text{g/ml}] = (A_{260/280nm}) (50) (\text{factor de dilución del plásmido})$$

3.12 Secuenciación y análisis de la secuencia del plásmido pRSET-*Ehpc4*.

Se realizó la secuenciación del plásmido empleando el kit ABI Prism BigDye Terminator, v2.0 y el secuenciador de DNA automático 31300 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). La reacción de secuenciación se llevó a cabo por el método enzimático de Sanger. La reacción se llevó a cabo en presencia de 500ng de DNA molde, 10 picomolar de un oligonucleótido específico (*Ehpc4*-S ó *Ehpc4*-As) y una mezcla del kit que contiene la enzima AmpliTaq DNA polimerasa y MgCl₂. Los resultados fueron generados y desplegados gráficamente por el programa Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystem) y se procedió a analizarlos.

4. Expresión y purificación de la proteína recombinante EhPC4.

4.1 Características de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

La cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS es uno de los sistemas bacterianos más usados para la expresión de genes, crece en medio mínimo y es deficiente de la actividad de endonucleasas de restricción y de las proteasas *lon* y *ompT*, lo que constituye una ventaja ya que se disminuye la posibilidad de degradación, tanto del plásmido con el que se transforman las células, como de la proteína que se requiere expresar. Dentro de su cromosoma está insertado el genoma del fago λ DE3, que porta el gen de la T7 RNA polimerasa, que a su vez está bajo el control del promotor fuerte *lacUV5*. Así mismo, porta un plásmido denominado pLysS que contiene el gen *LysS* que codifica para una lisozima de la RNA polimerasa T7 disminuyendo su concentración dentro de la célula, y a su vez también la activación del promotor T7. La activación de dicho promotor se lleva a cabo cuando se adiciona el inductor IPTG, esto permite un incremento en la concentración de la T7 RNA polimerasa, sobrepasando la inhibición por *LysS*. Debido a que nosotros trabajamos con células BL21(DE3) pLysS transformadas con el plásmido pRSET-Ehpc4, donde el gen *Ehpc4* se encuentra bajo el control del promotor T7, con la adición de IPTG fue posible incrementar la expresión de nuestra proteína de interés.

4.2 Preparación de células competentes *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

La preparación de células competentes frescas se realizó como se detalló la sección 3.5 y mediante un protocolo alterno para generar competentes congeladas, el cual permite almacenarlas por más tiempo a -70 °C. En dicho protocolo se inoculó 1 colonia de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS en 2 ml de medio LB líquido. Se incubó el precultivo toda la noche a 37 °C en agitación a 200 rpm. Se tomaron 100 μ l del precultivo y se inocularon 50 ml de medio SOB complementado con una solución de MgSO₄ a una concentración final 10 mM. Se incubó el cultivo a 37 °C en agitación a 220 rpm hasta alcanzar una D.O entre 0.4-0.6 a 600 nm. Durante este tiempo, todo el material que se utilizó (puntas, tubos de centrifuga y microcentrifuga) se enfrió. Cuando el cultivo alcanzó la D.O. deseada se cosecharon las células en un tubo de 50 ml estéril. Se incubaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron por 12 min a 2500 rpm a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla celular se resuspendió en 16 ml de la solución

RF1 (0.6 g de RbCl, 0.5 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.147 g de acetato de potasio, 0.0937 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5.95 ml de glicerol y agua cbp 50 ml) y se incubó durante 15 min en hielo. Después, se centrifugó a 4 °C durante 12 min a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 4 ml de la solución RF2 (1 ml de MOPS 0.5M, 0.6g de RbCl, 0.55 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 5.95 ml de glicerol, disueltos en agua bidestilada hasta alcanzar un volumen de 50ml) y se incubaron durante 15 min en hielo. Las células se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 100 µl, hasta su uso.

4.3 Transformación por choque térmico de bacterias *E.coli* BL21(DE3)pLysS con pRSET-Ehpc4.

Para la transformación de células competentes congeladas, en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se mezclaron 50 µl de células competentes congeladas *E. coli* BL21(DE3)pLysS y 100 ng del plásmido pRSET-Ehpc4. El protocolo se continuó tal como se detalla en la sección 3.6.

4.4 Inducción de la expresión de la proteína rEhPC4 en células de *E.coli* BL21(DE3)pLysS.

Para inducir a pequeña escala la expresión de la proteína recombinante rEhPC4 en células *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el plásmido pRSET-Ehpc4 seguimos un protocolo básico que permite hacer una primera evaluación de la expresión de la proteína recombinante a diferentes tiempos. Se eligieron 2 colonias de *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas las cuales inoculamos, por separado, en un tubo de vidrio con 5 ml de medio LB líquido y ampicilina. Se incubaron a 37 °C en agitación a 220 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.5-0.6 a 600 nm. Posteriormente se tomó una muestra de 1ml de cada tubo, y se colectaron en tubos de microcentrífuga. Estas muestras correspondieron al tiempo 0 (t=0) de inducción. Posteriormente, a los cultivos restantes se les adicionó IPTG a una concentración final 1 mM y se volvieron a incubar a 37 °C en agitación a 220 rpm. A las 3 y 6 h de haber adicionado el IPTG se midió la D.O. y se obtuvieron alícuotas de los cultivos de tal manera que, la cantidad de células fuera aproximada a la que se tomó en el t=0 (por ejemplo, si la D.O. es de 0.8 ó 1.0, se toman 800 ó 500 µl, respectivamente). Las muestras que tomamos a los tiempos 0, 3 y 6, se centrifugaron a 5000 rpm, durante 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y

la pastilla fue resuspendida en 70 μ l de amortiguador de carga para proteínas 5X. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

4.5 Análisis de la expresión de rEhPC4 mediante SDS-PAGE y por Western blot.

Las muestras de proteínas fueron analizadas en un minigel de poliacrilamida al 10%, el cuál se hizo en moldes de vidrio empleando el sistema de "Bio-Rad Mini-Protean II System". El minigel se compone de dos fases, una separadora y una concentradora. Para preparar 10 ml de solución separadora se mezclaron 4.017 ml de agua bidestilada, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8 ajustado con HCl, 3.33 ml de acrilamida-bis al 30%, 100 μ l de SDS al 10%, 50 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED. Para preparar 5 ml de solución concentradora se mezclaron 3 ml de agua bidestilada, 1.25 ml de Tris 0.5 M pH 6.8 ajustado con HCl, 650 μ l de acrilamida-bis al 30%, 50 μ l de SDS al 10%, 25 μ l de persulfato de amonio al 10% y 3 μ l de TEMED.

Las proteínas antes de ser depositadas en los minigeles se hirvieron por 3 min en baño María. Como referencia de tamaño molecular se corrió en un carril 3 μ l del marcador de peso Dual-Color preteñido (Bio-Rad). Las muestras una vez cargadas se resolvieron mediante electroforesis a 100 v en un amortiguador de corrida 1X para proteínas. Una vez resueltas las proteínas, el minigel se incubó en una solución teñidora durante 20-30 min. Posteriormente, el exceso de colorante se eliminó incubando el minigel en una solución desteñidora durante 1 h o hasta que las proteínas se observaron claramente. Finalmente, se hizo el análisis de los patrones de corrimiento de las proteínas en cada muestra comparando los carriles entre si.

Adicionalmente, determinamos la expresión de la proteína rEhPC4 mediante Western Blot. Para ello, preparamos un gel SDS-PAGE y resolvimos las muestras de proteínas. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m "Trans-Blot Transfer Medium" (Bio-Rad), en un amortiguador de transferencia 1X a 400 mA durante 45 min. La membrana fue lavada durante 5 min en el amortiguador PBS 1X-Tween. Para verificar la transferencia, la membrana se incubó en una solución del colorante rojo de Ponceau (Sigma) hasta visualizar las bandas de proteínas. Para desteñir las proteínas, la membrana se enjuagó con PBS 1X-Tween 0.05% en agitación y posteriormente se bloqueó por 2 h incubándola en la solución de bloqueo (leche al 5 % disuelta en amortiguador PBS 1X-Tween 0.05%). Posteriormente,

se le hicieron 3 lavados de 5 min cada uno en PBS1X-Tween 0.05% y se incubó la membrana durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario de ratón anti-histidina (*Roche*) diluido 1:2000 en una solución de leche al 2% en PBS1X-Tween 0.05%. Pasado el tiempo de incubación, la membrana fue lavada 3 veces (cada lavado de 5 min) en PBS 1X-Tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo primario. En seguida, se incubó la membrana a temperatura ambiente durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón peroxidado diluido 1:1000 en una solución de BSA al 2% en PBS 1X-Tween 0.05%. Después, se hicieron 2 lavados de 5 min y uno de 15 min con PBS 1X. La membrana fue incubada 1 min con 500 µl de sustrato para la peroxidasa (ECL, Ge Healthcare) y finalmente, fue expuesta a una placa fotográfica (*Kodak bioMax Light Film*), y revelada.

4.6 Determinación de la solubilidad de la proteína rEhPC4.

Una vez que se verificó la expresión de la proteína rEhPC4 en células *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con pRSET-*Ehpc4* e inducidas con IPTG, se realizaron pruebas de solubilidad de la proteína para determinar el protocolo mediante el cuál iba a purificarse. Para esto, se obtuvo una pastilla de 1.5 ml de células que expresaban la proteína rEhPC4 y se resuspendió en 5 ml de amortiguador de lisis con lisozima (sigma) en una concentración final de 1 mg/ml y se incubó en agitación a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 4 °C durante 40 min a 8000 rpm. El sobrenadante que contenía las proteínas de tipo soluble se recupera en un tubo nuevo. La pastilla se resuspendió nuevamente en 5 ml del amortiguador de lisis, esta fracción contenía las proteínas de tipo insoluble. Las fracciones soluble e insoluble fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 10%, en cada pozo se cargaron 10 µl de cada fracción con 10 µl de amortiguador de carga para proteínas 5X. El gel fue utilizado para un ensayo de Western blot empleando un anticuerpo primario de ratón anti-histidina (1:2000) y como secundario un anti-ratón peroxidado (1:1000). La membrana fue revelada mediante el sistema ECL (Ge Healthcare).

4.7 Inducción de la expresión de EhPC4 en cultivos masivos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Una vez determinada la solubilidad de la proteína rEhPC4, se hizo una inducción masiva en cultivo de 500 ml de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas e inducidas, tal como se detalló en el protocolo para inducciones a pequeña escala

(sección 4.4). El cultivo inducido durante 3 h se recuperó y centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, la pastilla se almacenó a -20 °C hasta la purificación de la proteína rEhPC4.

4.8 Purificación de la proteína rEhPC4 en condiciones nativas por cromatografía de afinidad mediante un gradiente de imidazol.

Para la purificación de la proteína rEhPC4, partimos de una pastilla de 500 ml obtenida de un cultivo masivo de células BL21(DE3)pLysS que previamente se verificó que expresaban la proteína de interés (sección 4.7). La pastilla se resuspendió en 7 ml de amortiguador de unión y para lisar las células se sonicó en hielo con 10 pulsos de 5 s e intervalos de 10 s entre cada uno. La mezcla se centrifugó durante 40 min a 8500 rpm, el sobrenadante se recuperó y se filtró con una membrana de 0.45 µm. De esta manera, la muestra estuvo lista para inyectarla en el cromatógrafo y purificar la proteína con una columna de Ni-NTA de 1 ml (Amersham). El programa empleado para la elusión fue por gradiente de Imidazol con un amortiguador de elusión. Las fracciones obtenidas por el cromatógrafo fueron analizadas en geles SDS-PAGE al 10%.

4.9 Análisis de las fracciones de purificación mediante SDS-PAGE y Western blot.

En base al gráfico de las fracciones de elusión de la proteína rEhPC4 que obtuvimos del cromatógrafo, se determinaron las que contenían una mayor cantidad de proteínas (que se observan como picos más altos dentro del gráfico) y éstas fueron analizadas en un minigel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie, para determinar la presencia y pureza de la proteína de interés. En cada carril se cargaron 10 µl de cada fracción de elusión. Estas mismas fracciones fueron analizadas por Western blot para verificar la identidad de la proteína rEhPC4 empleando como anticuerpo primario un anti-histidina de ratón diluido 1:2000 en una solución de leche al 2% en PBS1X-Tween 0.05% y como secundario un anti-ratón peroxidado diluido 1:1000 en la misma solución. La membrana fue revelada mediante el sistema ECL (Ge Healthcare).

4.10 Purificación de la proteína rEhPC4 mediante electroelusión.

Las fracciones que resultaron tener más enriquecida y pura la proteína rEhPC4 fueron resueltas en geles preparativos grandes SDS-PAGE al 10% (16cm x 16 cm) en condiciones desnaturizantes. En cada gel se cargaron 500 µl de las fracciones con

300 μ l de amortiguador de carga para proteínas y se corrieron toda la noche a 4 ° C y 50 v. Los geles se tiñeron incubándolos en una solución de azul de Coomasie y se destiñeron para detectar la proteína rEhPC4. La banda que correspondía a la proteína de interés fue cortada y almacenada en tubos limpios a 4 ° C, hasta su electroelusión.

Para la electroelusión se empleó el sistema “*Electro-Eluter*” de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de la proteína recombinante fueron cortadas en pedazos pequeños y depositadas en columnas de electroelusión. En el extremo inferior de estas columnas se coloca un tapón con una membrana que permite la captura de las proteínas de interés durante la electroelusión, la cuál fue previamente activada incubándola en el amortiguador de electroelusión por 1 h a 65 ° C. La proteína fue eluída dentro del amortiguador de electroelusión a 32 mA durante 2 h. Debido a que las proteínas están teñidas con azul de Coomasie, puede hacerse un seguimiento de su electroelusión de las proteínas. Una vez terminada la electroelusión, se recuperó la proteína recombinante de las membranas y se almacenaron a -20 ° C en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, hasta su uso.

4.11 Cuantificación de la proteína rEhPC4 por el método de Bradford.

Para determinar la cantidad de proteína rEhPC4 recuperada después de la electroelusión se siguió el método de cuantificación de proteínas descrito por Bradford (Ausubel y col., 1994). Primero, se realizó una curva patrón con una proteína de concentración conocida. Para esto, en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml se colocaron por separado 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 μ g de BSA, a cada tubo se le agregó la cantidad necesaria de NaCl 0.15 M para obtener un volumen final de 100 μ l y 1 ml del reactivo azul de Coomasie en solución. Los tubos fueron agitados vigorosamente durante 15 s e incubados 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm ($A_{595 \text{ nm}}$). Los datos obtenidos fueron graficados.

Para estimar la concentración de la proteína rEhPC4 en las muestras de electroelusión, se tomaron de 2 μ l y se mezclaron con 98 μ l de NaCl 0.15 M y 1 ml del reactivo azul de Coomasie y se midió su $A_{595 \text{ nm}}$. Los valores de absorbancia fueron comparados y extrapolados con los de la curva patrón de BSA para calcular la concentración de rEhPC4 en la muestra original.

5. Generación de anticuerpos policlonales específicos para EhPC4.

5.1 Protocolo de inmunización en conejo.

El protocolo de inmunización lo desarrollamos en un conejo macho cepa Nueva Zelanda de 2 Kg de peso. En la Figura 9, se muestra el esquema de inmunización que seguimos. Antes de aplicar la primera inmunización, se extrajeron 3 ml de sangre de la oreja del conejo para analizar el suero preinmune y verificar mediante Western blot que éste no tuviera anticuerpos que reconocieran proteínas en extractos celulares de *E.coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-Ehpc4, ni de trofozoítos de *E. histolytica*.

En el primer día de inmunización se aplicaron 300 µg de la proteína rEhPC4 pura mezclada con 300 µl de adyuvante completo de Freud, de manera subcutánea en diferentes regiones del lomo del conejo. En la segunda y tercera semana se aplicaron refuerzos de 150 µg de la proteína rEhPC4 pura mezclada con 150 µl de adyuvante incompleto de Freud, también de manera subcutánea. En la cuarta semana, antes de la inmunización con 150 µg de la proteína rEhPC4 mezclada con 150 µl de adyuvante incompleto, se hizo una extracción de 3 ml de sangre de la oreja del conejo para obtener suero inmune y analizarlo por Western blot y verificar la producción de anticuerpos específicos para la proteína rEhPC4 pura y en extractos de células inducidas *E.coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-Ehpc4. Una vez que se verificó mediante Western blot la presencia de anticuerpos anti-EhPC4 en el suero inmune de la cuarta semana de inmunización, a la quinta se extrajeron 15 ml de sangre de la oreja del conejo para la obtención del suero inmune.

5.2 Obtención del suero preinmune e inmune.

Para obtener el suero preinmune e inmune, las muestras fueron tratadas de la siguiente manera: la sangre fue colectada en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml e incubada inmediatamente a 37 °C durante 40 min, posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min y el sobrenadante, que correspondía al suero (inmune o preinmune), se recuperó en tubos nuevos y se alicuotó para su almacenamiento a -20 °C, hasta su uso.

5.3 Análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-EhPC4 mediante Western blot.

Para estimar la cantidad y reactividad de los anticuerpos específicos en el suero inmune, se resolvieron extractos celulares inducidos y sin inducir de *E.coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-Ehpc4 en geles SDS-PAGE al 10%, como control usamos la proteína recombinante pura. Posteriormente, las proteínas resueltas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con el suero preinmune o inmune en una dilución 1:1000 en PBS1X-Tween 0.05%-leche al 2% durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día, se le hicieron 3 lavados a la membrana de 5 min cada uno en PBS1X-Tween 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo peroxidado en una dilución 1:8000 en PBS1X-Tween 0.05%-leche al 2% durante 2h a temperatura ambiente. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.




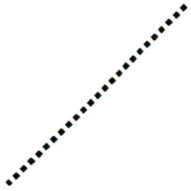
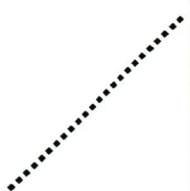






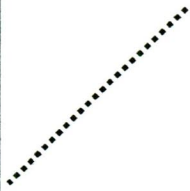
	1ª semana de	2ª semana de Inmunización	3ª semana de Inmunización	4ª semana de Inmunización	5ª semana Extracción de sangre
Sangrado	Extracción de 3 ml de sangre (suero preinmune) 			Extracción de 3 ml de sangre (suero inmune) 	Extracción de 15 ml de sangre (suero inmune) 
Inmunización	300µg rEhPC4 + Adyuvante Completo Freud Subcutáneo 	150µg rEhPC4 + Adyuvante incompleto Freud Subcutáneo 	150µg rEhPC4 + Adyuvante incompleto Freud Subcutáneo 	150µg rEhPC4 + Adyuvante incompleto Freud Subcutáneo 	

Figura 9. Esquema de inmunización en conejo. Se muestran los días, la cantidad de la proteína recombinante aplicada, así como el tipo y cantidad de adyuvante empleado.

6. Localización de la proteína EhPC4 en extractos nucleares y citoplasmáticos de *E. histolytica* mediante Western blot.

6.1 Obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos de trofozoítos de *E. histolytica*.

Los extractos citoplasmáticos y nucleares se prepararon según el método descrito por Schreiber y *col.* (1989). Trofozoítos de *E. histolytica* HM1: IMSS fueron cultivados en 50 ml de medio hasta un estado confluyente. El cultivo de trofozoítos (1×10^6 células) se pasó a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 4 °C a 2500 rpm, durante 7 min. Se decantó el sobrenadante para obtener la pastilla celular. Para lavar la pastilla, ésta fue resuspendida en 1 ml de amortiguador PBS 1X pH 6.8 frío, se centrifugó 5 min a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió suavemente en 400 µl del amortiguador A frío y se incubó la mezcla en hielo durante 15 min. Durante este periodo, las células fueron monitoreadas bajo el microscopio para verificar que se las células se hincharan y redondearan. Después, se les adicionaron 25 µl de una solución de Nonidet NP-40 al 10% con 50 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Sigma*). Las células se agitaron vigorosamente durante 10 s y se tomó una alícuota de 1 µl para observarla bajo el microscopio y asegurarnos de que las células se habían lisisado completamente. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm y el sobrenadante que corresponde a las proteínas citoplasmáticas se alícuotó en tubos de microcentrifuga e inmediatamente se almacenados a -70 °C hasta su uso. La pastilla de núcleos se resuspendió en 50 µl de amortiguador C frío y 50 µl de la mezcla de inhibidores de proteasas. El tubo se agitó vigorosamente durante 15 min a 4 °C y posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante que corresponde a las proteínas nucleares, se recuperó y alícuotó e inmediatamente fueron almacenados a -70 °C, hasta su uso. La cuantificación de los extractos se realizó mediante el método de Bradford, para ello, fueron empleados 3 µl de cada fracción y se prepararon tal como se detalló en la sección 4.11. Para comprobar la calidad de los extractos, muestras de 100 µg de cada extracto fueron resueltas en geles de SDS-PAGE al 10% y visualizados por tinción con azul de Coomassie.

6.2 Localización de EhPC4 en extractos nucleares y citoplasmáticos de *E. histolytica* mediante Western blot.

Para determinar la localización de la proteína EhPC4 en extractos de *E. histolytica*, se tomaron en un tubo de microcentrífuga 300 µg de extractos nucleares y citoplasmáticos, y se mezclaron con 30 µl de amortiguador de carga para proteínas 5X. Las muestras fueron mezcladas por inversión y hervidas en baño María durante 5 min antes de ser cargadas en un gel de SDS-PAGE al 10%. En cada carril se cargaron 100 µg de extractos y se resolvieron a 100 v, aproximadamente 90 min; como patrón de referencia para el corrimiento se cargaron 3 µl de marcador de peso molecular Dual-Color (Bio-Rad). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente teñidas con rojo de Ponceau. Se cortó la membrana en tres partes, de tal manera que cada parte incluyera un carril de cada tipo de extracto. Las membranas fueron desteñidas e incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C. Como anticuerpo primario, una de las membranas se incubó con suero preinmune diluido 1:1000, otra con suero inmune anti-EhPC4 diluido 1:1000 y la tercera con el anticuerpo control anti-EhDEAD1. Al siguiente día, las membranas se lavaron 3 veces, cada lavado de 5 min, con PBS1X-Tween 0.05%. Después, se incubaron las tres con un anticuerpo anti-conejo peroxidado durante 1 h a temperatura ambiente en una dilución 1:8000. Las membranas fueron reveladas bajo las mismas condiciones empleando el sistema ECL.

7. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética.

7.1 Amplificación, purificación y cuantificación del fragmento de DNA de 174 pb.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la proteína PC4 de humano tiene la capacidad de unirse en las regiones promotoras, cerca del sitio de inicio de la transcripción, de los genes en los cuales promueve o reprime su transcripción. Para determinar la afinidad del posible factor de transcripción EhPC4 a dsDNA, elegimos como sonda de DNA un fragmento de la región promotora del gen *Ehadh112* (de la adhesina 112) de *E. histolytica* del cual se conocen sus sitios de inicio de la transcripción.

Primero, amplificamos por PCR la sonda ds174 a partir de la construcción p400CAT-*EhAdh* (donado por la Dra. Elisa Azuara), la cual tiene clonado un fragmento de 400pb

del promotor del gen *Ehadh112*, que a su vez contiene al fragmento de ds174, empleando oligonucleótidos específicos en sentido y antisentido del promotor del gen de la adhesina. En la **Tabla V** se muestra la secuencia y el nombre para cada uno de los oligonucleótidos.

oligonucleótidos	longitud	Secuencia
<i>Adh S-151</i>	31 bases	5´-AAA ACT GCA GTT TAT TTT TAT GAT TTG ATT G -3´
<i>ADh AS-30New</i>	35 bases	5´ -CCC AAG CTT TTC AGG AAT GAA TTG TCT ATT CAT CT -3´

Tabla V. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento ds174 por PCR.

Se montaron 5 reacciones, para ello se añadieron en tubos de PCR 1 µl de dNTP´s 10 mM, 20 picomoles de cada oligonucleótido, 2 µl de MgCl₂ 5 mM, 1 U de Taq DNA polimerasa (invitrogen), 5 µl de amortiguador de reacción 10 X para la enzima Taq DNA polimerasa y como templado, 100 ng del plásmido p400CAT-*EhAdh*, en un volumen final de reacción de 50 µl. Las mezclas de reacción se sometieron a un ciclo de desnaturalización del DNA durante 5 min a 94 °C, posteriormente, 25 ciclos de polimerización y extensión que comprenden 30 s a 94 °C; 30 s a 50 °C; 35 s a 72 °C; y finalmente a un ciclo de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE1X. Las bandas correspondientes al fragmento de 174 pb fueron cortadas y purificadas con “*QIAquick Gel Extraction Kit*” de QUIAGEN. Después de la purificación la sonda se cuantificó por espectrofotometría a A₆₀₀.

7.2 Marcaje con α -³²P[dATP] del fragmento de 174pb dsDNA, purificación y cuantificación de la sonda de 174pb.

El fragmento de dsDNA de 174pb fue marcado radioactivamente con el isótopo α -³²P[dATP] por la técnica de “*random primer*” oligonucleótidos al azar. Para ello, se desnaturalizó el fragmento ds174 incubándolo durante 5 min en agua hirviendo. Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción para el marcaje utilizando el kit comercial “*Prime-a-Gene® Labeling System*” (Promega). 500 ng de la sonda ds174 fueron mezclados con 10 µl de amortiguador de marcaje 5 X, 20 µM de dNTPs, 20 µg

de BSA, 5 U de DNA pol I (fragmento Klenow) de *E. coli*, la mezcla de reacción se llevó a cabo en 48 μ l con agua libre de nucleasas y por último, se le adicionaron 200 μ Ci/mmol de nucleótidos marcados con el isótopo fósforo 32 (α - 32 P[dATP]). La mezcla fue incubada durante 1 h a 37 °C.

La remoción de los nucleótidos radiactivos no incorporados a la sonda ds174 se realizó mediante la filtración de la reacción de marcaje en columnas de exclusión molecular Sephadex G-50 (*Pharmacia*). Para preparar la columna, primero se preparó la resina Sephadex G-50 en amortiguador TE, posteriormente, se vertió la resina en solución en un cartucho de jeringa de 1ml al cuál previamente se le colocó un tapón de fibra de vidrio en la punta, y se centrifugó 2 min a 2000 rpm para empaquetar la resina; Luego, se rellenó el cartucho con más resina en solución y se volvió a empaquetar por centrifugación; así sucesivamente hasta que el cartucho quedó lleno. Una vez que se tuvo lista la columna, los 50 μ l totales de la mezcla de reacción de marcaje fueron depositados en la resina y se centrifugaron 2 min a 2000 rpm. Durante la centrifugación, por la punta de la columna eluyó la mezcla de marcaje diluída previamente en 50 μ l de amortiguador TBE, por lo que fué necesario colocar un tubo de microcentrífuga colector en este paso. Finalmente, se obtuvo el tubo colector con la sonda marcada la cual fué almacenada a 4 °C hasta su uso.

Para la cuantificación de la sonda ds174 purificada, 2 μ l de la sonda se colocaron en un cuadro de papel Watman de 1 cm², después ésta muestra se colocó en un vial de vidrio al que previamente se habían adicionado 3 ml de líquido de centelleo. La cuantificación se hizo en un contador de centelleo (Beckman). Como control, se puso un blanco que consiste de un vial con 3 ml de líquido de centelleo.

7.3 Preparación de la proteína rEhPC4.

La purificación de la proteína recombinante se realizó en condiciones nativas. Primero, se preparó un cultivo masivo de 150 ml de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el vector pRSET-Ehpc4 e inducidas por 3 h con IPTG. Las células se empastillaron por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 3 ml de amortiguador de lisis. Las células se rompieron por sonicación de la muestra en hielo con 10 pulsos de 5 s e intervalos de 10 s entre cada uno. El homogeneizado se centrifugó a 8500 rpm durante 40 min.

El sobrenadante se recuperó y se hicieron alícuotas de 0.5 ml en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. A cada alícuota se le adicionaron 150 μ l de resina de Ni-NTA previamente equilibrada con el amortiguador de lisis y se incubaron 1 h en agitación ligera a 4 °C. Durante la incubación, a un cartucho de jeringa de 3 ml se le tapó la punta con fibra de vidrio, cuando la resina terminó de incubarse con el sobrenadante, ésta fue vertida al cartucho hasta que toda la resina quedó empaquetada. La columna fue enjuagada pasándola a través de ella 10 ml de amortiguador de lavado. Para la elusión de la proteína rEhPC4, se adicionaron 2 ml de amortiguador de elusión y durante este paso se recuperaron fracciones de elusión de 0.5 ml. La cuantificación de la proteína rEhPC4 purificada se determinó por el método de Bradford y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

7.4 Ensayos de retardamiento y superretardamiento de la movilidad electroforética.

Para los ensayos de unión a dsDNA se empleó una solución de espermidina-magnesio y un amortiguador de unión 5X (ver apéndice). Antes de usar el amortiguador de unión se le adicionaron 10 μ l/ml de inhibidores de proteasas.

El gel para resolver los productos de la reacción de unión dsDNA-proteína, se preparó de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas (ver apéndice), la mezcla se vació entre moldes de vidrio de 20x20cm para su polimerización y se colocó un peine para 15 pozos. El gel una vez polimerizado se precorrió por 30 min en amortiguador TBE 0.5 X a 100 v. Durante el precorrimiento del gel se montaron las reacciones de unión dsDNA-rEhPC4. Se realizaron 14 reacciones (**Tabla VIa**): Reacción 1, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, sonda marcada 10000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Reacción 2, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de rEhPC4, sonda marcada 10000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Reacción 3, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de rEhPC4, sonda marcada 10000 cpm, competidor específico en un exceso molar y agua c.b.p. 20 μ l. Reacción 4, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de rEhPC4, sonda marcada 10000 cpm y competidor inespecífico en un exceso molar. Reacción 5, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de rEhPC4, 1 μ l del anticuerpo α -EhPC4, sonda marcada 10000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Reacción 6, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de rEhPC4, 5 μ l del anticuerpo α -EhPC4, sonda marcada 10000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l.

Reacción 7, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 3 μ g de BSA, sonda marcada 10000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Las reacciones se hicieron por duplicado (reacciones 8-14), con la única diferencia en la concentración de proteína rEhPC4 y BSA (6 μ g).

Las reacciones 1 y 8 corresponden a la sonda libre; la 2 y 9 son de interacción rEhPC4 con la sonda ds174; la 3 y 10 corresponden a la competencia específica; la 4 y 11 corresponden a la competencia inespecífica; las reacciones 5 y 12, así como la 6 y 13, corresponden a las reacciones de superretardamiento con diferentes concentraciones de anticuerpo. Finalmente, las reacciones 7 y 14 corresponden a un control de unión con BSA, una proteína que se sabe que no tiene capacidad para interactuar con el DNA. Las reacciones totales se resolvieron en el gel de poliacrilamida al 6% en el orden que se muestra en la **Tabla VIa**. En un carril se cargaron 6 μ l de amortiguador de carga para DNA 5X, para hacer el seguimiento de la corrida. El gel se corrió a 120 v aproximadamente 3 h, hasta que el primer colorante del amortiguador de carga se salió del gel. Posterior a la corrida, el gel fue desmontado de los vidrios y colocado en un secador de geles a 80 °C en vacío durante 40 min. Una vez que estuvo completamente seco, éste se expuso a una placa sensible a radioactividad durante toda la noche. Finalmente, se digitalizó la imagen y se analizaron los resultados.

Para los ensayos de superretardamiento se prepararon 6 reacciones por duplicado (**Tabla VIb**): Reacción 1, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, sonda marcada 20000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Reacción 2, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 6 μ g de rEhPC4, sonda marcada 20000 cpm y agua c.b.p. 20 μ l. Reacciones 3, 4, 5 y 6, 5 μ l de SpMg⁺, 4 μ l de amortiguador de unión, 6 μ g de rEhPC4, sonda marcada 20000 cpm, 5, 7.5, 10 y 12.5 μ l del anticuerpo α -EhPC4, respectivamente, y agua c.b.p. 20 μ l. Las reacciones fueron resueltas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 % y posteriormente secado y digitalizado, tal como se detalló anteriormente.

a)

Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SpMg+	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Amortiguador de unión	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l
rEhPC4	---	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	---	---	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	3 μ g	
BSA	---	---	---	---	---	---	3 μ g	---	---	---	---	---	---	3 μ g
α -EhPC4	---	---	---	---	1 μ l	5 μ l	---	---	---	---	---	1 μ l	5 μ l	---
Sonda marcada	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm	10000 cpm
C.E.	---	---	3 μ l	---	---	---	---	---	---	3 μ l	---	---	---	---
	---	---	---	7.7 μ l	---	---	---	---	---	---	7.7 μ l	---	---	---
Agua (c.b.p.)	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

b)

Carril	1	2	3	4	5	6
SpMg+	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Amortiguador de unión	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l	4 μ l
rEhPC4	---	6 μ g	6 μ g	6 μ g	6 μ g	6 μ g
α -EhPC4	---	---	5 μ l	7.5 μ l	10 μ l	12.5 μ l
Sonda marcada	20000 cpm	20000 cpm	20000 cpm	20000 cpm	20000 cpm	20000 cpm
Agua (c.b.p.)	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Tabla VI. Reactivos y sus respectivas concentraciones empleadas para cada una de las reacciones de unión proteína-dsDNA. (a) Ensayo de retardamiento. (b) Ensayo de superretardamiento. C.E., competidor específico; C.I., competidor inespecífico; α -EhPC4, anticuerpo anti-EhPC4.

V. Resultados

1. Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.

En esta sección del trabajo, nos enfocamos en el estudio de la secuencia predicha de aminoácidos de EhPC4 mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

Obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4 en las bases de datos del genoma de *E. histolytica*.

Para realizar el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4, primero obtuvimos la secuencia de 127 aa de su homólogo en humano PC4, reportada en la base de datos del NCBI con el número de acceso P53999, la cuál nos sirvió como sonda para la obtención mediante BLAST de un posible homólogo en las bases de datos del genoma de *E. histolytica* (TIGR y Pathema). En la **Tabla VII** se muestran los resultados arrojados por el BLAST. La base de datos del TIGR arrojó una secuencia con número de acceso 69.m00181 que corresponde a un posible coactivador transcripcional de 151 aa (con un peso predicho de 18 kDa) con valores de identidad del 25%, similitud del 53% y de $E=1.6 \times 10^{-10}$, con respecto a PC4 de humano. La base de datos del Pathema arrojó una secuencia con número de acceso XM_648786, que al compararla con la del TIGR, resultó ser la misma.

El hecho de que en las dos bases de datos del genoma de *E. histolytica* encontramos una sola secuencia con porcentajes estadísticamente significativos de similitud, identidad y valor de E, nos sugiere que *E. histolytica* presenta un solo homólogo a la proteína PC4 de humano y que codifica para un posible factor de transcripción, el cuál denominamos EhPC4, Eh, de *Entamoeba histolytica* y PC4 como referencia a su homólogo. El gen que codifica para EhPC4 no presenta intrones, se ubica dentro del genoma de *E. histolytica* en el locus 69.m00181, scaffold 00069, del nucleótido 54371 al 53916.

Secuenciación del plásmido pRSET-EhPC4.

La determinación de la secuencia del gen *Ehpc4* clonado en pRSET-A se hizo mediante secuenciación, empleando un oligonucleótido antisentido específico. En la **Figura 10a** se muestra el electroferograma obtenido a partir de la secuenciación del

plásmido pRSET-Ehpc4. A la secuencia de nucleótidos arrojada se le determinó su reversa complementaria y se tradujo a aminoácidos. Posteriormente, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron comparadas mediante un alineamiento, con las secuencias de EhPC4 de nucleótidos y aminoácidos anotadas en las bases de datos del genoma de *E. histolytica*. En la **Figura 10b** se muestra el alineamiento a nivel de aminoácidos. La secuencia de EhPC4 que obtuvimos por secuenciación, resultó ser idéntica a la anotada en el TIGR y Pathema. Con ésta secuencia, realizamos los análisis *in silico*.

Búsqueda de ortólogos de EhPC4 mediante BLAST.

El BLAST en la base de datos de ExpASY empleando como sonda la secuencia de aminoácidos de EhPC4, arrojó una lista de proteínas ordenadas en base a su valor de E, donde se observó que la mayoría de ellas eran hipotéticos coactivadores transcripcionales de la RNA pol II. De la lista escogimos solo una muestra representativa de 13 especies: de los vertebrados mamíferos elegimos a *H. sapiens* (Hs) y *R. norvegicus* (Rn); de los anfibios a *X. laevis* (Xl); de las aves a *G. gallus* (Gg) y de los peces a *B. rerio* (Br). Del grupo de los invertebrados elegimos a *C. elegans* (Ce), de las plantas a *A. thaliana* (At) y de los hongos a *A. fumigatus* (Af) y *S. cerevisiae* (Sc). Finalmente, del grupo de los protozoarios elegimos a *T. thermophila* (Tt), *D. discoideum* (Dd) y *T. vaginalis* (Tv).

En la **Tabla VIII** se muestran los resultados obtenidos, en ella se puede observar que existen proteínas con valores de E y porcentajes de similitud e identidad estadísticamente significativos, que sugieren homología con EhPC4. Los valores de E van desde $5.8e^{-40}$ a $5e^{-3}$, los porcentajes de identidad van de 30-46 %, y los de similitud del 76-61 %. Las proteínas identificadas por el BLAST se encuentran en organismos distribuidos a lo largo de la escala evolutiva de los eucariontes, desde organismos unicelulares como *D. discoideum*, hasta multicelulares como *A. thaliana*. Se observa que EhPC4 presenta una mayor similitud de secuencia con las proteínas de organismos eucariontes unicelulares, especialmente con otros protistas como son *Tetrahymena thermophila* (69% de similitud y 46% de identidad) y *D. discoideum* (64% de similitud y 44% de identidad).

Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de EhPC4 y sus ortólogos.

Con fin de comparar y analizar la secuencia de aminoácidos de EhPC4 con las de sus proteínas ortólogas, generamos un alineamiento múltiple. En la **Figura 11** se muestra el alineamiento en formato BOXSHADE donde los residuos de aminoácidos idénticos entre 3 o más secuencias están sombreados en negro y en gris los aminoácidos conservados.

En el alinamiento se puede observar que la región central y C-terminal de la mayoría de las proteínas es la más conservada, a excepción de Sub 1 de *S. cerevisiae*, donde la región conservada se ubica en la región N-terminal. Esto se debe a que ésta proteína es considerablemente más larga que las demás, está conformada por 292 residuos de aminoácidos, cuando el promedio de las otras es de 128 (**Tabla IX**). Dentro de la región más conservada, se encuentran 9 aminoácidos (F, R, E, P, K, G, I, S y L) que son idénticos en todas las secuencias analizadas (**Figura 11**), 4 de estos (F, R, P y K) se han descrito que participan en la unión de PC4 al DNA. La región N-terminal no parece tener un residuo de aa idéntico en todas las secuencias, sin embargo se observan varios residuos de serina (S) y lisina (K), que parecen estar conservados en la mayoría de las secuencias.

Análisis filogenético de la proteína EhPC4 y sus ortólogos.

La filogenia molecular es el estudio de las relaciones evolutivas entre organismos o moléculas mediante el uso de secuencias y datos moleculares, los cuáles son empleados para generar un árbol o hipótesis filogenética que refleje los mecanismos de evolución e historia de los organismos. Para el análisis filogenético de EhPC4 y sus proteínas ortólogas se empleó el método de distancia Neighbor Joining (NJ) y para verificar la robustez de la topología del árbol se aplicó la prueba de bootstrap con 1000 réplicas. En la **Figura 12** se muestra el árbol sin raíz obtenido.

Los valores de bootstrap señalan la presencia de 3 agrupaciones soportadas estadísticamente, debido a que éstos están por arriba de 50. El grupo (A) lo conforman todas las proteínas de mamíferos incluidas en el estudio (Zgc_109973 de *B. rerio*, RCJMB04 de *G. gallus*, PC4 de *H. sapiens*, Sub1 de *R. norvegicus* y MGC81442 de *X. laevis*), por lo que es considerado como monofilético. Otro grupo (B) que parece haber divergido de manera temprana en comparación con las proteínas

de eucariontes multicelulares lo conforman EhPC4 de *E. histolytica* y DDB_0216410 de *D. discoideum*. El tercer grupo (C) está compuesto por AFUA_2G07460 del hongo *A. fumigatus* y KELP de la planta *A. thaliana*. Las otras agrupaciones, principalmente aquellas ramas más tempranas, se encuentran por abajo del valor de corte (50) de bootstrap, por lo tanto, las predicciones no son robustas y es difícil hacer una inferencia de la relación existente entre las secuencias.

Búsqueda de dominios funcionales y estructurales de EhPC4.

En la región N-terminal de la proteína EhPC4 identificamos una región rica en ácido glutámico (E) y lisina (K), que comprende del residuo 4 al 85; y 2 probables dominios funcionales sobrelapados en su extremo C-terminal, uno de transactivación denominado PC4 que comprende del residuo de aminoácido 64 al 150 y otro de unión a DNA de cadena sencilla que va del residuo 89 al 151. Además, un motivo altamente conservado que parece estar implicado en la unión de la proteína con el DNA, éste consta de 5 aa (KGISL) ubicados en las posiciones 127-131. En la **Figura 13** se muestran esquematizados los resultados obtenidos en las bases de datos de Inter-Pro y MOTIF SCAN para las predicciones de dominios funcionales y motivos estructurales. En la misma figura se señalan con flechas los residuos de aminoácidos que previamente se han determinado experimentalmente que están implicados en la interacción de PC4 de humano con ssDNA (Werten Sebastiaan y Moras Dino, 2006), las flechas negras señalan los 4 residuos de aa (F, R, P y K) que son idénticos entre PC4 y EhPC4.

Determinación de las modificaciones postraduccionales de EhPC4.

Para predecir las probables modificaciones postraduccionales de EhPC4, sometimos su secuencia de aminoácidos al programa MOTIF SCAN. La **Figura 14** resume los resultados arrojados por el programa. Se predice que EhPC4 presenta alrededor de 19 sitios posibles de reconocimiento para CKII, principalmente en residuos de ácido glutámico (E) y serina (S); 12 posibles sitios de reconocimiento para PKC, principalmente en residuos de ácido aspárico (D), lisina (K) y serina (S); y 9 sitios consecutivos para la TYR entre que comprenden los residuos de aa 82-90.

a)

Sonda utilizada	Homólogo en <i>E. histolytica</i>	# acceso TIGR/Pathema	identidad (%)	similitud (%)	Longitud (aminoácidos)	Valor de E
PC4 (<i>H. sapiens</i>)	Coactivador transcripcional hipotético	69.m00181 XM_648786	25	53	151	1.6 e ⁻¹⁰

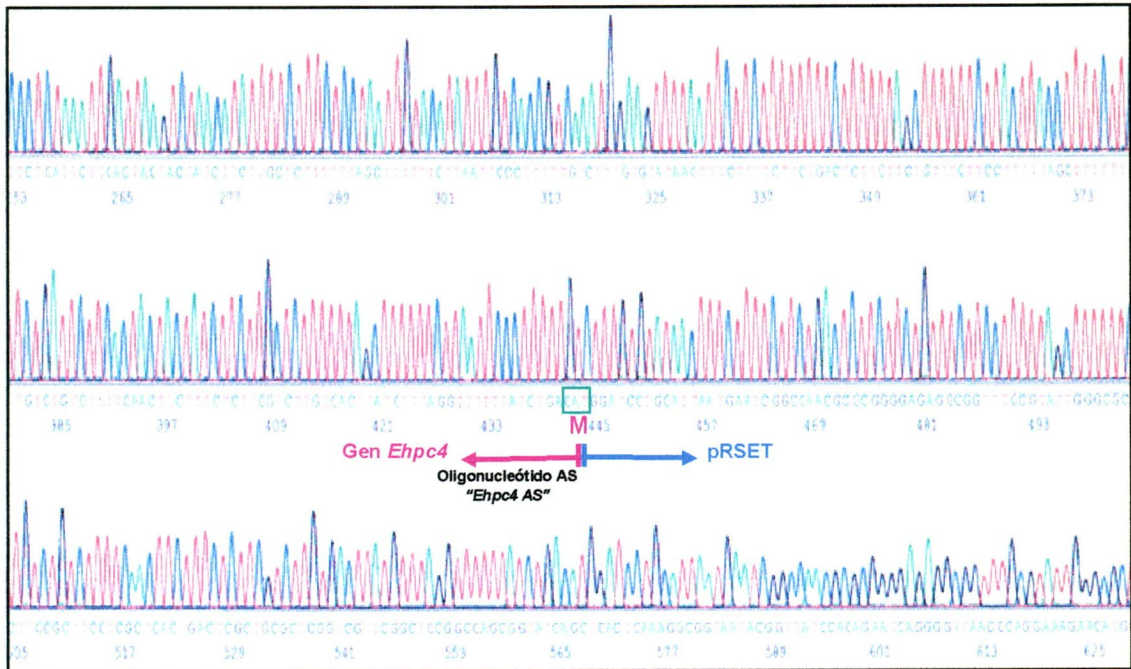
b)

```
MSDKKPKHKS QDEEKEVEKT DKKKAKKEET  
EEESEKKVI HKDKKGIKKK AKKEQEDSSS  
EESEEEKVSK KKAKKEKKEE LKLPGDGDKY  
VQLGERKYVR LNQFRGTKYI DVREFYERDG
```

Tabla VII. El genoma de *E. histolytica* presenta un gen homólogo a PC4 de humano.

- (a) Características de la secuencia de 151 aa correspondiente a la proteína EhPC4.
(b) Secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4.

a)



b)

```

TIGR/Pathema MSDKKPKHKSQDEEKEVEKTDKKKAKKEETEEESEEKKVIHKDKKGIKKKAKKEQEDSSS
Secuenciación MSDKKPKHKSQDEEKEVEKTDKKKAKKEETEEESEEKKVIHKDKKGIKKKAKKEQEDSSS
*****

EESEEEKVSKKKAKKEKKEELKLPFDGDKYVQLGERKYVRLNQFRGTKYIDVREFYERDG
EESEEEKVSKKKAKKEKKEELKLPFDGDKYVQLGERKYVRLNQFRGTKYIDVREFYERDG
*****

ELKPGQKGISLKD
ELKPGQKGISLKD
*****

```

Figura 10. Secuenciación del gen *Ehpc4* clonado en pRSET. La amplificación de la secuencia se hizo empleando el oligonucleótido antisentido para el gen *Ehpc4*. (a) En el electroferograma se muestra la secuencia de nucleótidos complementaria a la del gen *Ehpc4*, la flecha rosa indica la región de inicio de la traducción del gen y la azul indica el inicio de la secuencia del plásmido, enmarcados en un rectángulo verde se señalan los nucleótidos correspondientes a la metionina inicial del gen. A la secuencia obtenida por secuenciación se le determinó su reversa complementaria y posteriormente se tradujo a aminoácidos, ésta última se comparó mediante un alineamiento con la anotada en las bases de datos del TIGR y Pathema para la proteína EhPC4. Se observa que ambas secuencias son idénticas (b).

Proteína	Organismo	Valor de E	Identidad (%)	Similitud (%)	Longitud (aa)
Coactivador transcripcional, hipotético	<i>Entamoeba histolytica (Eh)</i>	5.8e ⁻⁴⁰	100	100	151
Coactivador transcripcional de la RNA pol II, hipotético	<i>Tetrahymena thermophila (Tt)</i>	4e ⁻¹⁰	46	69	84
Regulador de la transcripción de unión a ssDNA.	<i>Dictyostelium discoideum (Dd)</i>	4e ⁻⁸	44	64	141
Coactivador transcripcional de RNA pol II, hipotético	<i>Aspergillus fumigatus (Af)</i>	3e ⁻⁷	39	66	165
Zgc_109973	<i>Brachidario rerio (Br)</i>	9e ⁻⁷	38	66	123
PC4	<i>Homo sapiens (Hs)</i>	8e ⁻⁶	40	65	127
Proteína hipotética	<i>Gallus gallus (Gg)</i>	9e ⁻⁶	41	69	126
MGC 81442	<i>Xenopus laevis (Xl)</i>	1e ⁻⁵	38	63	128
Activador transcripcional de RNA pol II (p15)	<i>Rathus novergicus (Rn)</i>	1e ⁻⁵	40	65	127
Coactivador transcripcional de RNA pol II SUB1	<i>Saccharomyces cerevisiae (Sc)</i>	2e ⁻⁵	44	61	292
Activador transcripcional de RNA pol II KELP	<i>Arabidopsis thaliana (At)</i>	5e ⁻⁵	32	61	165
Proteína hipotética	<i>Caenorhabditis elegans (Ce)</i>	2e ⁻⁴	30	66	124
Coactivador Transcripcional	<i>Trichomonas vaginalis (Tv)</i>	6e ⁻³	40	72	96

Tabla VIII. Proteína EhPC4 y sus ortólogos de diversos organismos.

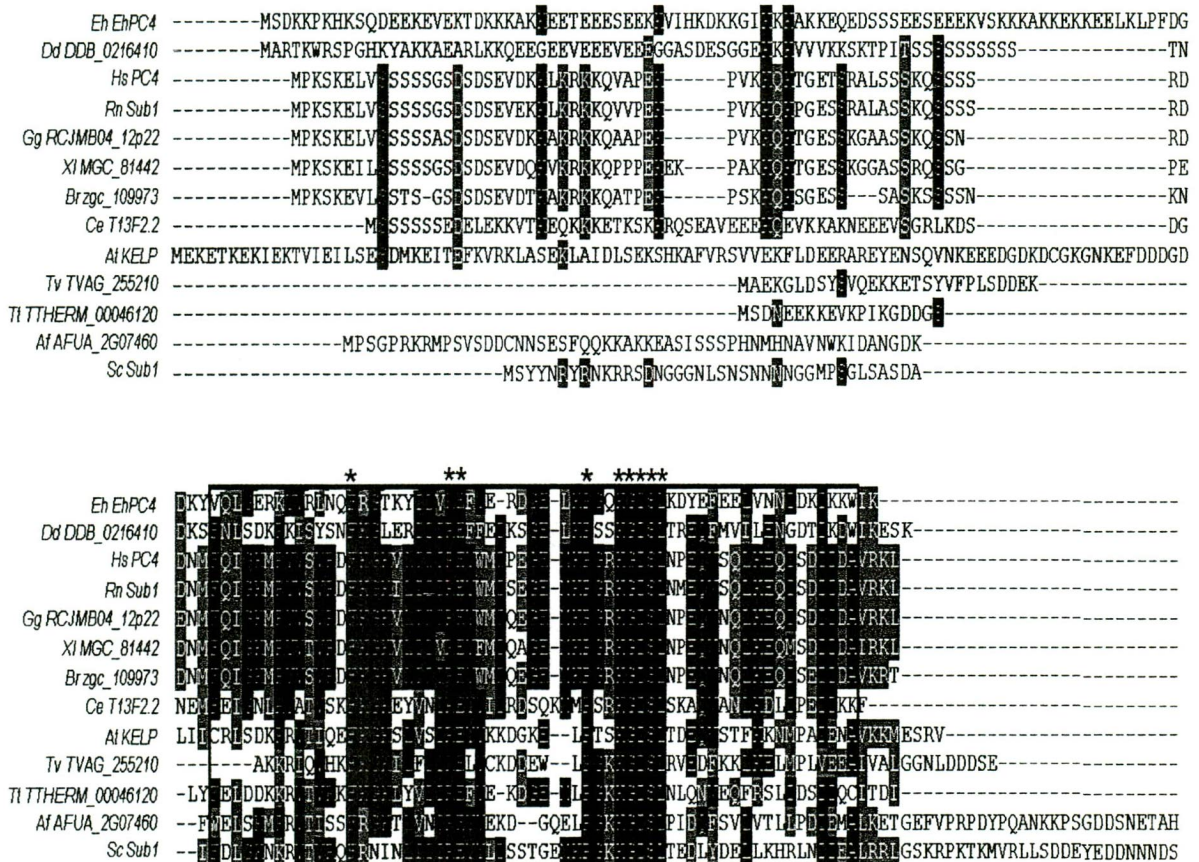


Figura 11. Alineamiento de EhPC4 con sus proteínas ortólogas. Se muestra el alineamiento múltiple generado por Clustal W y editado con BOXSHADE, el cual sombrea en negro los residuos de aminoácidos idénticos en 3 o más secuencias y en gris los residuos con cambios conservados. La caja negra hace énfasis de la región más conservada de las proteínas. Con asteriscos se señalan los residuos de aminoácidos que son idénticos en todas las secuencias estudiadas. En el alineamiento se compara la secuencia completa de EhPC4 con las de sus proteínas ortólogas de los organismos *D. discoideum* (*Dd*), *H. sapiens* (*Hs*), *R. novergicus* (*Rn*), *G. gallus* (*Gg*), *B. rerio* (*Br*), *X. lavéis* (*XI*), *C. elegans* (*Ce*), *T. thermophyla*, *A. thaliana* (*At*), *A. fumigatus* (*Af*), *T. vaginalis* (*Tv*) y *S. cerevisiae* (*Sc*).

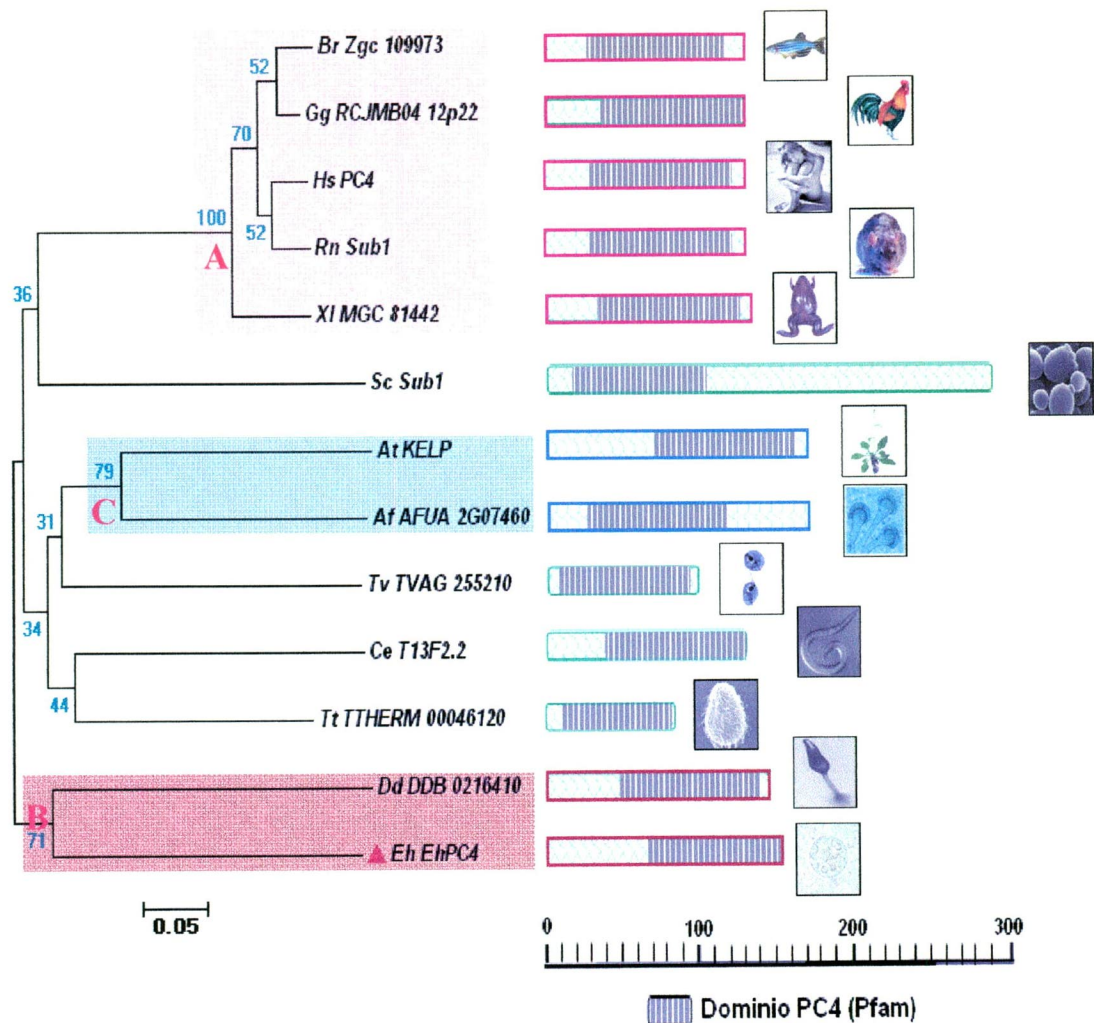
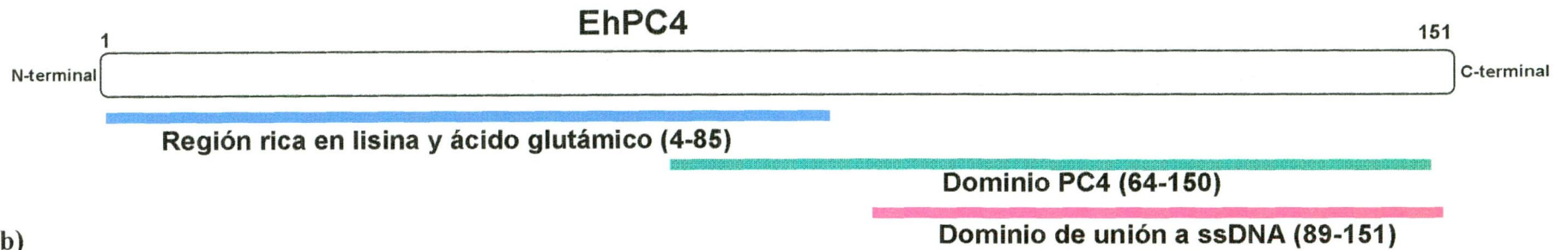


Figura 12. Inferencia filogenética de EhPC4 y sus proteínas ortólogas. A la izquierda de la figura se observa el árbol sin raíz obtenido mediante el programa MEGA 4.0 por N.J de 13 secuencias de proteínas. Los números en los nodos indican el soporte estadístico del agrupamiento de las ramas por el método de “bootstrap” con 1000 replicas. La barra en la parte inferior izquierda del alineamiento es una referencia de la longitud de las ramas del árbol, que indica las distancias evolutivas dentro de las proteínas. A la derecha de la figura, se muestra una esquematización de las proteínas en donde se muestra la localización de la región más conservada entre ellas, que corresponde al dominio denominado PC4 (Pfam). La barra en la parte inferior derecha hace referencia a la longitud de la secuencia primaria de las proteínas. Las letras rojas (A, B, C y D) hacen referencia a las diferentes agrupaciones soportadas estadísticamente por *bootstrap* con un valor de corte de 50. *Hs*, *H. sapiens*; *Rn*, *R. norvegicus*; *Xl*, *X. laevis*; *Gg*, *G. gallus*; *Br*, *B. rerio*; *Ce*, *C. elegans*; *At*, *A. thaliana*; *Af*, *A. fumigatus*; *Sc*, *S. cerevisiae*; *Tt*, *T. thermophila*; *Dd*, *D. discoideum*; *Tv*, *T. vaginalis* y *Eh*, *E. histolytica*.

a)



b)

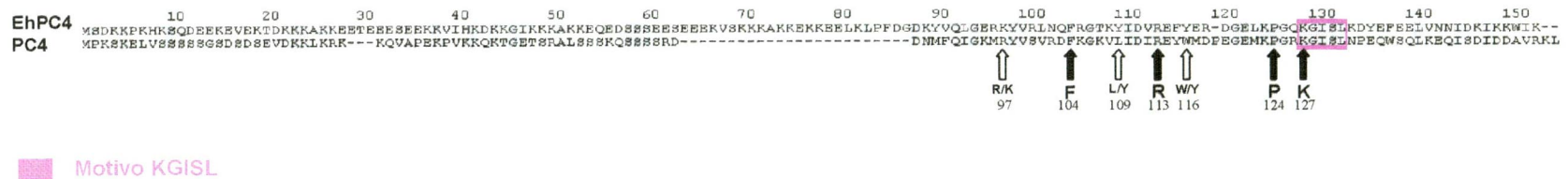


Figura 13. Dominios funcionales y motivos estructurales de la proteína EhPC4. Las predicciones se hicieron en base a la comparación de la secuencia de aminoácidos de EhPC4 con las contenidas en las bases de datos InterPro-Scan y MOTIF SCAN. (a) Por MOTIF SCAN se detectó una región rica en lisina (K) y ácido glutámico (E) (barra en color azul). InterPro-Scan predijo 2 dominios funcionales superpuestos en la región C-terminal, uno denominado PC4 (barra en color verde) y uno de unión a DNA de cadena sencilla (barra de color rojo). (b) Alineamiento pareado entre la secuencia de aminoácidos de PC4 y EhPC4, donde se observa en una caja morada un motivo KGISL en la región C-terminal de ambas proteínas, en ésta misma región, las flechas muestran los aminoácidos (R, F, L, R, W, P, y K) que previamente se han reportado que están implicados en la interacción de PC4 de humano con ssDNA, las flechas en color negro señalan los aminoácidos idénticos en en las dos secuencias (F, R, P y K).

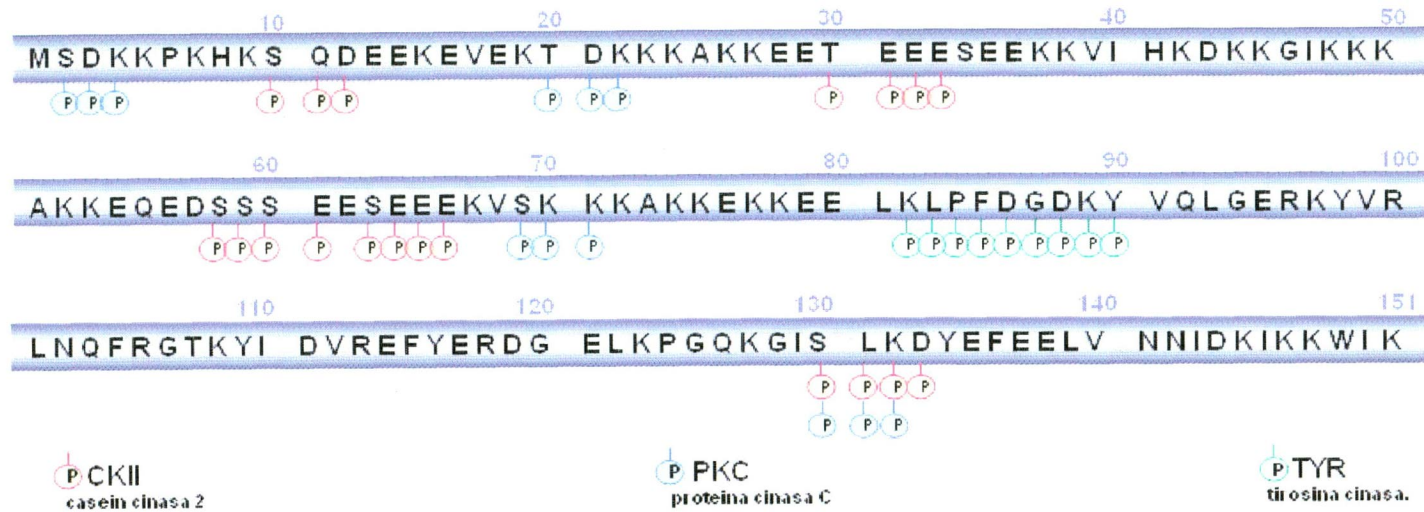


Figura 14. Sitios de fosforilación predichos por el programa MOTIF SCAN para la secuencia de aminoácidos de la proteína EhPC4. En la figura se muestra la secuencia completa de aminoácidos de la proteína EhPC4, donde se marcan con anaranjado los sitios hipotéticos de fosforilación para CKII (caseina cinasa II), en azul los sitios de reconocimiento para PKC (proteína cinasa C) y en verde los sitios para TYR (tirosina cinasa).

Determinación de la estructura secundaria de EhPC4.

La determinación de la estructura de una proteína es clave para inferir su función. Algunos de los programas de asignación de estructura se basan en su homología con otras proteínas a las que se conoce su estructura y función. Realizamos una predicción de la estructura secundaria de la proteína EhPC4 usando el programa PBIL. En la **Figura 15** se muestra la predicción consenso obtenida con el programa y se compara con la estructura secundaria de PC4 (R. Werten y cols. 1999). Los resultados muestran que la región N-terminal de la proteína está compuesta básicamente de 3 α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) separadas por "loops". La región C-terminal se compone principalmente de 4 hojas- β ($\beta 1$ - $\beta 4$) y 2 α -hélices ($\alpha 4$ y $\alpha 5$) separadas por "loops". Las estructuras consenso predichas para EhPC4 por y PBIL para la región C-terminal de EhPC4 son muy similares a la determinada experimentalmente para CTD-PC4 de humano, ya que ésta última consta de 4 hojas- β ($\beta 1$ - $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 4'$) y 1 α -hélice ($\alpha 1$).

Determinación de la estructura terciaria de EhPC4.

La estructura terciaria de una proteína es el arreglo en 3 dimensiones que se forma a partir del plegamiento de las estructuras secundarias (α -hélices, hojas- β y "loops"). Como templado para el modelaje por homología de EhPC4 empleamos la estructura con la clave 1PCF reportada en el PDB (<http://www.pdb.com>), que corresponde al dominio C-terminal de la proteína PC4 de *H. sapiens*, la cuál fué determinada por difracción de rayos X (Brandsen y cols., 1997). En la **Figura 16** se muestra una comparación de la estructura terciaria del CTD-PC4 de humano (de la metionina 63 a la leucina 127) con la predicha por Swiss Model para CTD-EhPC4 (de la tirosina 90 a la lisina 151). En rojo se muestran las estructuras α -hélices, en amarillo las hojas- β y en verde los loops. EhPC4 presenta las 5 hojas- β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4'$, $\beta 4$) y la α -hélice ($\alpha 1$), que son características de PC4. Así mismo, en la proteína de humano se muestran los residuos que participan en su interacción con el DNA y son comparados con los residuos correspondiente en la de *E. histolytica*. Cuatro de siete aminoácidos son idénticos en ambas proteínas, F(104), R(113), P(124) y K(127) de *E. histolytica*. Se observa que ambas proteínas presentan estructuras tridimensionales conservadas lo que apoya la idea de que existe homología entre ellas, y por lo tanto pudieran conservar una función biológica parecida.

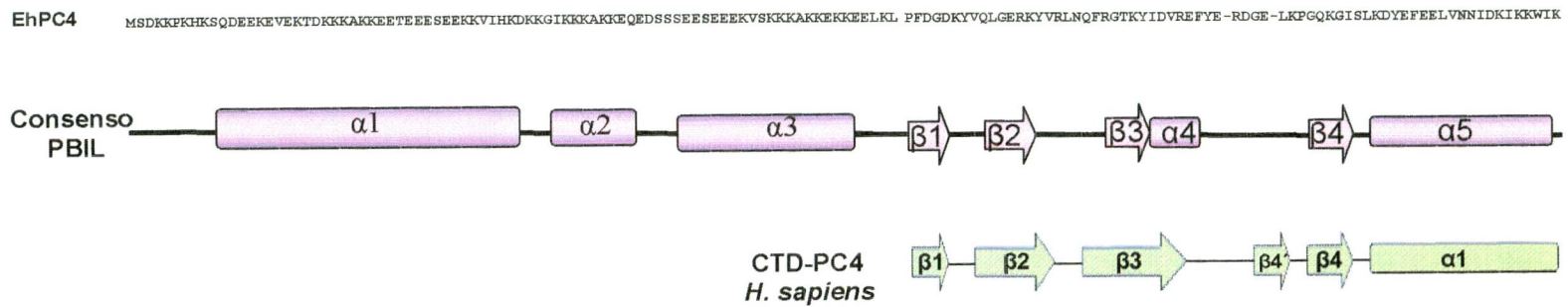
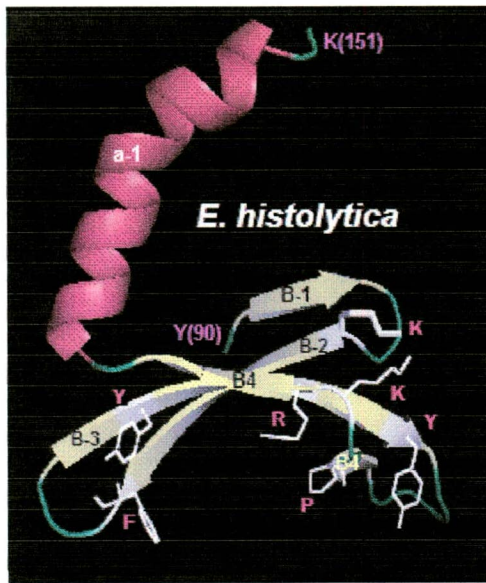
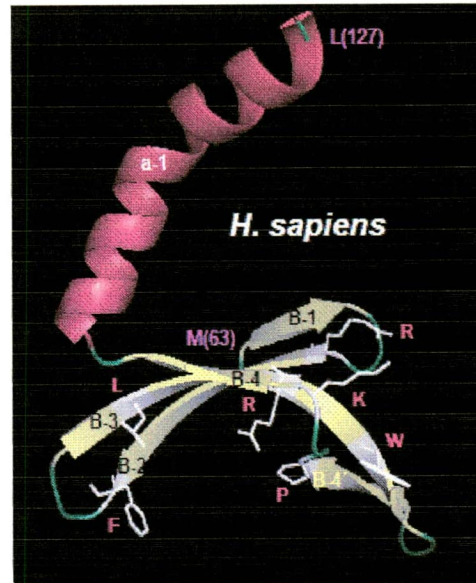


Figura 15. Estructura secundaria consenso predicha para EhPC4. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia completa de la proteína EhPC4 de *E. histolytica*. En rosa se muestra la estructura consenso predicha para EhPC4 por el programa PBIL. En verde, se esquematiza la estructura secundaria determinada para el dominio C-terminal de la proteína PC4 de *H. sapiens*. α , alfa hélice; β , hoja beta.

a)



b)



c)

<i>E. histolytica</i>	<i>H. sapiens</i>
K(97)	R(70)
F(104)	F(77)
Y(109)	L(82)
R(113)	R(86)
Y(116)	W(89)
P(124)	P(98)
K(127)	K(101)

Figura 16. Comparación de la estructura tridimensional de CTD-EhPC4 con CTD-PC4. (a) Estructura tridimensional hipotética del CTD- EhPC4 de *E. histolytica* determinada por el programa Swiss model, que comprende de la Y(90) a la K(151). (b) Estructura tridimensional de CTD-PC4 (número de acceso en el PDB: 1PCF) empleada como templado para el modelaje de EhPC4, que comprende de la M(63) a la L(127). EhPC4 presenta las 5 hojas- β (β -1, β -2, β -3, β -4, β -5) y la α -hélice (α -1), que son características de PC4. En la proteína de humano se muestran los residuos que participan en su interacción con el DNA y son comparados con los residuos correspondiente en la de *E. histolytica*. (c) Tabla comparativa entre los residuos de aminoácidos implicados en la interacción de PC4 con el DNA y los residuos correspondientes en la proteína de *E. histolytica*. En rojo se muestran las estructuras α -hélices, en amarillo las hojas- β y en verde los *loops*.

2. Análisis de la expresión del mRNA del gen *Ehpc4* por RT-PCR en trofozoítos de las clonas A y L6 de *E. histolytica*.

Con la finalidad de detectar la expresión de los mRNAs de los genes *Ehpc4* y *actina* en trofozoítos de las clonas L6 y A de *E. histolytica*, decidimos analizar los niveles de transcritos bajo condiciones basales de cultivo. Para esto, realizamos ensayos de RT-PCR empleando un par de oligonucleótidos específicos que amplifican la secuencia completa de 453 pb del gen *Ehpc4* y otro par que amplifica una región interna de 222 pb del gen de *actina*. En la **Figura 17** se muestran los resultados obtenidos en éste ensayo donde se observa que bajo estas condiciones la expresión del gen *Ehpc4* es detectada solamente en la clona A, no así en la L6. La expresión del mRNA del gen de *actina*, que es empleado como control interno, es la misma en ambas clonas.

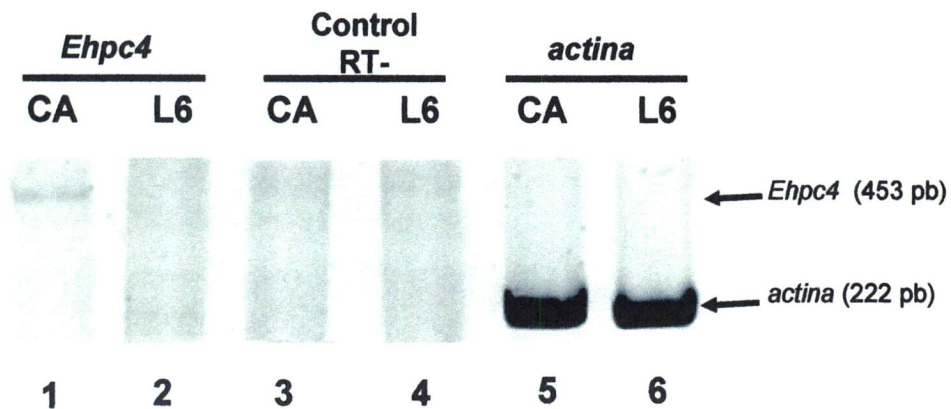


Figura 17. Análisis de la expresión del mRNA de los genes *Ehpc4* y *actina* en las clonas A y L6 de *E. histolytica*. El cDNA obtenido a partir de 2 μ g de RNA total de cada clona fue sometido a 25 ciclos de amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes. Carril 1 y 2, amplificación por PCR de *Ehpc4* en la clona A y L6, respectivamente. Carril 3 y 4, control negativo (RT-) de la amplificación por PCR de *Ehpc4* en la clona A y L6, respectivamente. Carril 5 y 6, amplificación por PCR de *actina* en la clona A y L6, respectivamente.

3. Clonación del gen *Ehpc4* en el vector de expresión pRSET-A.

El vector pRSET-A ha sido diseñado para su uso en la expresión de proteínas recombinantes de interés en células de *E. coli* y para su posterior purificación y detección de manera sencilla. En la **Figura 18** se muestra un esquema con las principales características del plásmido pRSET-A. Durante la expresión del gen de interés la RNA polimerasa T7, que se expresa en cantidades altas cuando a las células *E. coli* BL21(DE3)pLysS se les adiciona el inductor IPTG, reconoce específicamente el promotor T7 y transcribe la secuencia presente rio abajo.

Durante la clonación del gen *Ehpc4* en el plásmido pRSET-A obtuvimos 8 colonias candidatas (sección 3.6), a las cuales se les realizó una minipreparación para la extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina (sección 3.7) y de esta manera detectar la presencia del plásmido pRSET-*Ehpc4*. De las 8 colonias, 7 presentaban plásmido, de los cuales se analizaron 2 por restricción con las enzimas *Bam*H1 y *Hind*III y mediante amplificación por PCR empleando oligonucleótidos específicos (secciones 3.8 y 3.9) para determinar la presencia del inserto *Ehpc4*. Los productos de PCR y de restricción fueron resueltos mediante electroforesis en un gel de agarosa. En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos. Mediante restricción (carriles 2 y 3) se observó la liberación de un inserto de aproximadamente 453 pb y una banda de aproximadamente 2827 pb que corresponde al tamaño esperado para el plásmido pRSET sin inserto. Mediante PCR (carriles 4 y 5) se observó la amplificación de un fragmento de DNA de aproximadamente 453 pb que corresponde al tamaño esperado para el gen *Ehpc4*.

El plásmido de la clona positiva 7 (C7) fue purificado y secuenciado con oligonucleótidos en sentido y antisentido específicos para el gen *Ehpc4* y así corroborar su clonación y analizar su secuencia. En la **Figura 20** se esquematizan los resultados de la secuenciación. Se observa que el gen completo *Ehpc4* fue clonado en marco de lectura con el vector y no presentó mutaciones a lo largo de su secuencia, esto último se verificó mediante una comparación con la secuencia reportada en las bases de datos del genoma de *E. histolytica*.

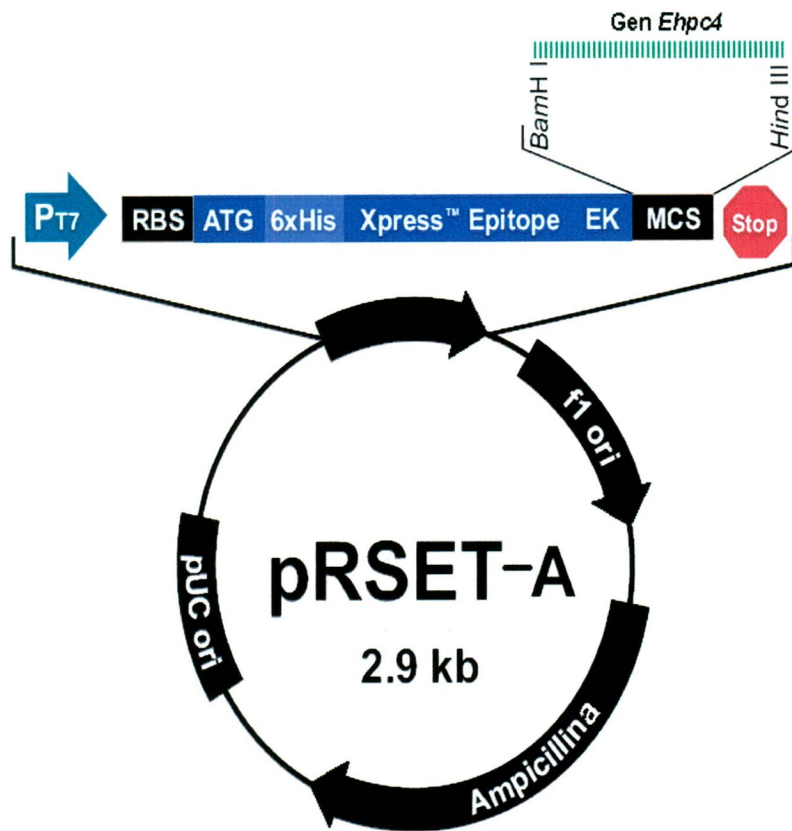


Figura 18. Representación esquemática del gen *Ehpc4* clonado en el plásmido pRSET-A en los sitios de restricción *BamH*I y *Hind*III. El vector pRSET-A presenta una secuencia que corresponde al promotor fuerte e inducible T7, lo que generalmente permite obtener altos niveles de expresión de la proteína de interés; un sitio de inicio de la traducción o ATG; una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas, que funcionan como un dominio de unión a metales, lo que permite su purificación por cromatografía con el uso de una columna de níquel. Además, una secuencia de estabilización del transcrito del gen 10 del fago T7 y un sitio de reconocimiento para una enzima enterocinasa, que permite la eliminación de la etiqueta de polihistidinas de la proteína recombinante si se requiere; un sitio de unión a ribosomas (RBS); un sitio múltiple de clonación (MCS); un gen de ampicilina que confiere resistencia a ampicilina y dos orígenes de replicación. La secuencia completa del gen *Ehpc4* la clonamos en el sitio múltiple de clonación, entre los sitios *BamH*I y *Hind*III.

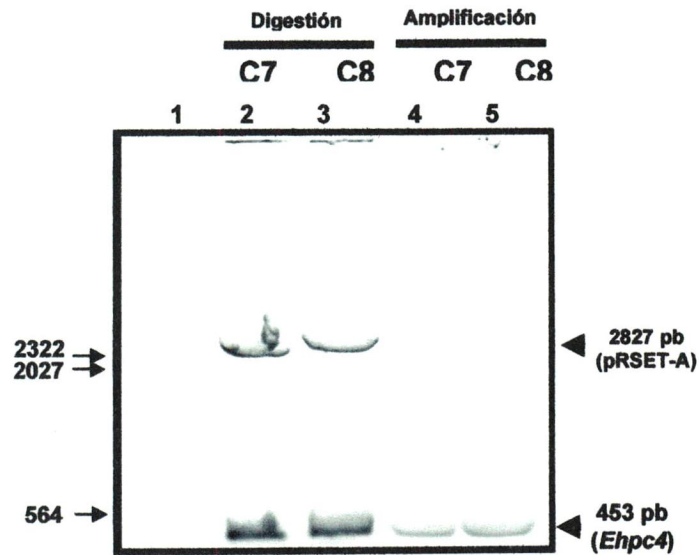
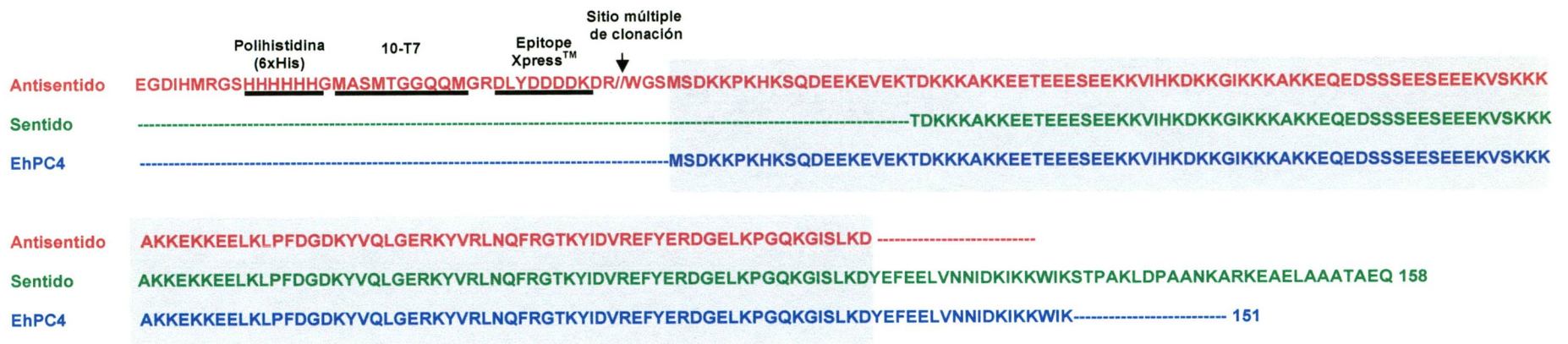


Figura 19. Análisis de los plásmidos candidatos para verificar la clonación del gen *Ehpc4* en el plásmido pRSET-A. Gel de agarosa al 1% corrido en amortiguador TAE 1X. Carril 1, 250 ng del marcador de tamaño molecular λ HindIII; Carril 2 y 3, 1 μ g de plásmido de la clona 7 (C7) y 1 μ g de plásmido de la clona 8 (C8), respectivamente, digeridos con 1 U de enzima *Bam*HI y 1 U de *Hind*III. Carril 4 y 5, amplificación por PCR del gen *Ehpc4* empleando como templado 100 ng del plásmido de la clona C7 y C8, respectivamente. En el carril 2 y 3 se observan dos productos de aproximadamente 453 y 2827 pb, que corresponden al inserto *Ehpc4* y al vector pRSET, respectivamente. En los carriles 4 y 5 se observa un producto de aproximadamente 453 pb que corresponde al amplificado del gen *Ehpc4*.



Gen Ehpc4

Figura 20. Resultados de la secuenciación del plásmido pRSET-*Ehpc4*. Alineamiento entre la secuencia de aminoácidos que aparece en las bases de datos de *E. histolytica* para EhPC4 (azul) y las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la traducción de la secuencia de nucleótidos obtenida de la secuenciación del plásmido pRSET-*Ehpc4*, empleando oligonucleótidos específicos en sentido (verde) y antisentido (rojo) para el gen *Ehpc4*. En la figura se señalan las secuencias que corresponden a la etiqueta de 6 histidinas, a la proteína T7, el epítipo Xpress y el inicio del sitio múltiple de clonación. La región sombreada en gris indica la secuencia que corresponde al gen *Ehpc4*.

4. Expresión y purificación de la proteína rEhPC4.

La expresión y purificación de proteínas recombinantes facilita la producción y detallada caracterización de virtualmente cualquier proteína. Actualmente se ha desarrollado una amplia variedad de sistemas de expresión que se utilizan para producir proteínas recombinantes fusionadas a una etiqueta, por ejemplo, 6 histidinas. El uso de etiquetas facilita la purificación de la proteína recombinante mediante métodos de cromatografía de afinidad.

Nosotros inducimos la expresión de la proteína rEhPC4 unida a una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) en cultivos a pequeña escala de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS. En la **Figura 21** se muestran los resultados de la inducción. En la **Figura 21a** se muestra un gel SDS-PAGE al 10% donde se resolvieron los extractos celulares bajo las diferentes condiciones probadas durante la inducción de la proteína rEhPC4. Carril 1; marcador de peso molecular Dual-Color (*Biorad*); carril 2, extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS; carriles 3, 4 y 5, extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con la clona C7 del plásmido pRSET-*Ehpc4*, e inducidas 0, 3 y 6 h, respectivamente; carriles 6, 7 y 8, células BL21(DE3)pLysS transformadas con la clona C8 del plásmido pRSET-*Ehpc4* C8, e inducidas 0, 3 y 6 h, respectivamente; carriles 9 y 10, extractos celulares de *E. coli* BL(DE3)pLysS transformadas con pRSET-*DEAD1* inducidas 3 y 6 h, respectivamente (empleadas como control de inducción).

En el gel teñido con azul de Coomassie se observó una banda enriquecida de aproximadamente 21.8 kDa (que es el tamaño esperado para la proteína rEhPC4) en los carriles 4, 5, 7 y 8. A simple vista no se observaron diferencias significativas en la expresión de la proteína a las 3 y 6 h de inducción con IPTG (carriles 4 y 5, respectivamente). Así mismo, se observó que el plásmido pRSET-*Ehpc4* mantenía una transcripción basal del gen *Ehpc4*, ya que en células transformadas pero sin inducir (carriles 3 y 6) también se observó la banda de 21.8 kDa, aunque más tenue. La expresión de rEhPC4 no fue observada en células BL21(DE3)pLysS sin transformar (carril 2). En los carriles 9 y 10 se observa una banda enriquecida a 50 kDa que es el tamaño esperado para la proteína rDEAD1, que empleamos como control de inducción. En la **Figura 21b** se muestra la autoradiografía obtenida mediante Western blot para la verificación de la inducción, donde se observa que la proteína rEhPC4 se expresa en células transformadas sin inducir (carriles 3 y 6), e inducidas con IPTG a

diferentes tiempos (carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8). No se observó la inducción de la proteína recombinante en extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS sin transformar.

La determinación de la solubilidad intracelular de la proteína rEhPC4 (sección 4.6) es clave en la elección del protocolo para su purificación. En la **Figura 22** se muestran los resultados del Western blot obtenidos para determinar la solubilidad de rEhPC4. Carril 1 y 2 corresponden a 5 y 10 μ l, respectivamente, de la fracción soluble de células BL21(DE3)pLysS transformadas con el plásmido *pRSET-Ehpc4* e inducidas con IPTG y los carriles 3 y 4 corresponden a 5 y 10 μ l, respectivamente, de la fracción insoluble de las mismas células. El carril 5 corresponde a extractos celulares totales de células transformadas e inducidas. En el Western se observa que la proteína recombinante se encuentra solo en las fracciones solubles, esto nos permitió determinar que la purificación de rEhPC4 la realizaríamos bajo condiciones nativas.

Para la purificación de la proteína rEhPC4 se preparó un cultivo masivo (sección 4.7) de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el plásmido *pRSET-Ehpc4*. Como observamos que no había diferencias significativas en la expresión de la proteína a las 3 y 6 h de inducción con IPTG, el tiempo de inducción empleado para los cultivos masivos de fue de 3 h. Antes de iniciar el protocolo de purificación se verificó la expresión de rEhPC4 en este cultivo mediante Western blot. En la **Figura 23** se muestran los resultados de la expresión de la proteína EhPC4 por Western blot en el cultivo masivo. El carril 1 corresponde a células BL21(DE3)pLysS transformadas con *pRSET-EhPC4* y el carril 2 a células transformadas e inducidas por 3 h con IPTG. Como control positivo del Western se resolvieron extractos celulares que expresan EhPC4. Estos resultados corroboran la expresión de la proteína recombinante en el cultivo sin inducir y que incrementa su expresión después de 3 h de inducción con IPTG (carril 2).

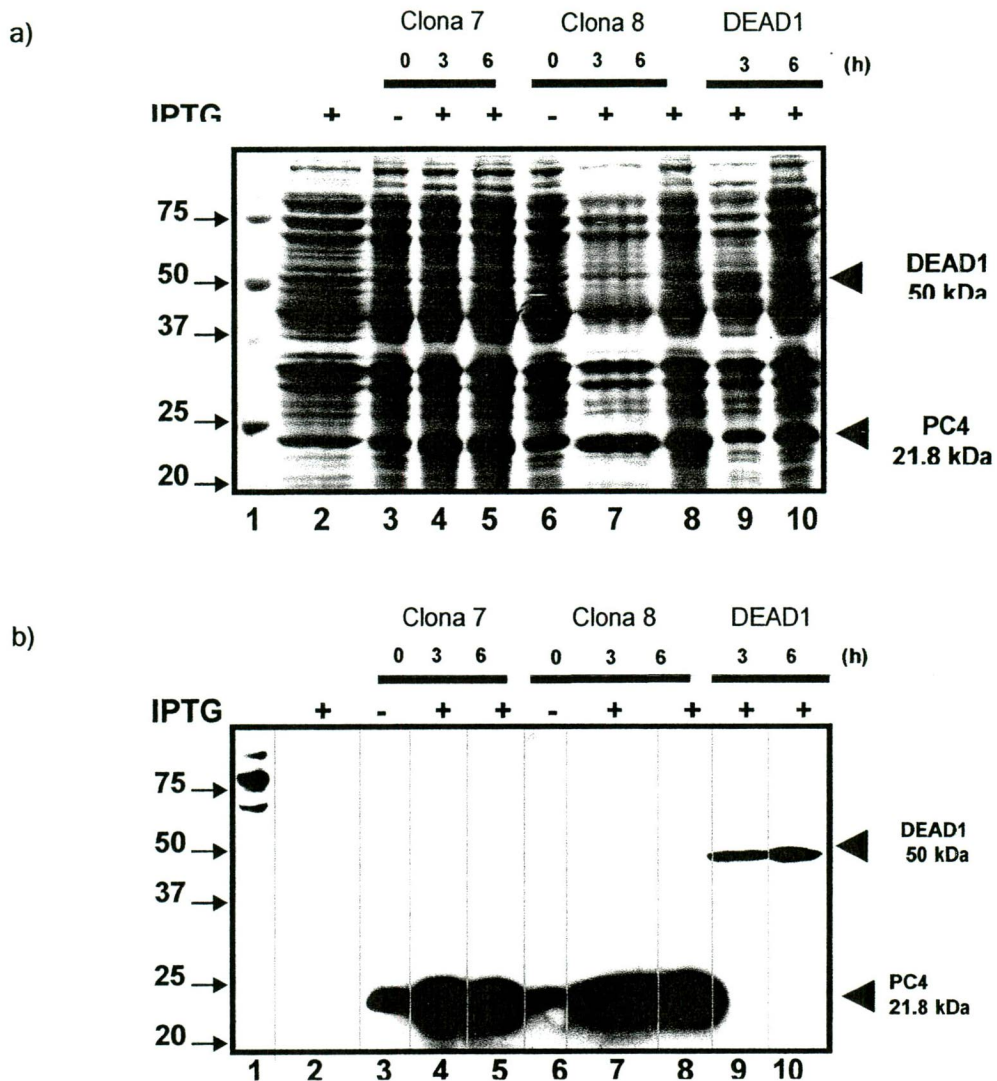


Figura 21. Expresión de la proteína rEhPC4 en células BL21(DE3)pLysS transformados con pRSET-*Ehpc4*. (a) Gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. Carril1, marcador de peso molecular Dual-color; carril 2, células BL21(DE3)pLysS; carriles 3, 4 y 5, células BL21(DE3)pLysS transformadas con la clona C7 del plásmido pRSET-*Ehpc4* e inducidas 0, 3 y 6 h, respectivamente; carriles 6, 7 y 8, células BL21(DE3)pLysS transformadas con la clona C8 del plásmido pRSET-*Ehpc4* C8 e inducidas 0, 3 y 6 h, respectivamente; carriles 9 y 10, células BL21(DE3)pLysS transformados con pRSET-*DEAD1* inducidas 3 y 6 h, respectivamente. (b) Western blot de extractos celulares BL21(DE3)pLysS sin transformar y transformadas, los extractos fueron resueltos en el mismo orden que el gel del panel superior. Para el Western blot se empleó como anticuerpo primario y secundario un α -6XHis (1:2000) y un anti-ratón peroxidado (1:1000), respectivamente. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.

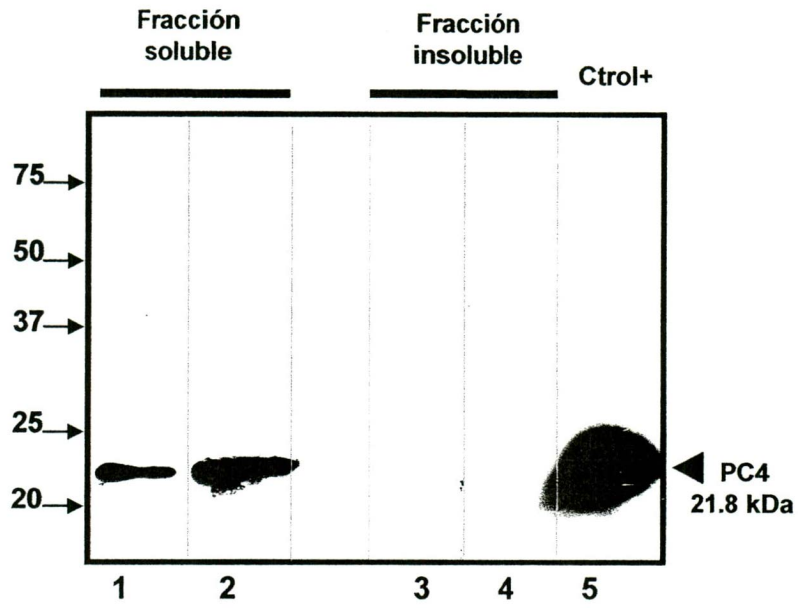


Figura 22. Prueba de solubilidad para la proteína rEhPC4. Western blot de las fracciones de solubles e insolubles de células que expresan a la proteína EhPC4. Carril 1, 5 μ l de la fracción soluble. Carril 2, 10 μ l de la fracción soluble. Carril 3, 5 μ l de la fracción insoluble. Carril 4, 10 μ l de la fracción insoluble, Carril 5, extractos de células *E. coli* BL21pLysS transformadas con pRSET-Ehpc4 e inducidas 3 h con IPTG. A la izquierda se muestra con flechas como referencia el marcador de peso molecular. Como anticuerpo primario se utilizó un α -6xHis 1:2000 y como secundario un anti-ratón peroxidado 1:1000. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.

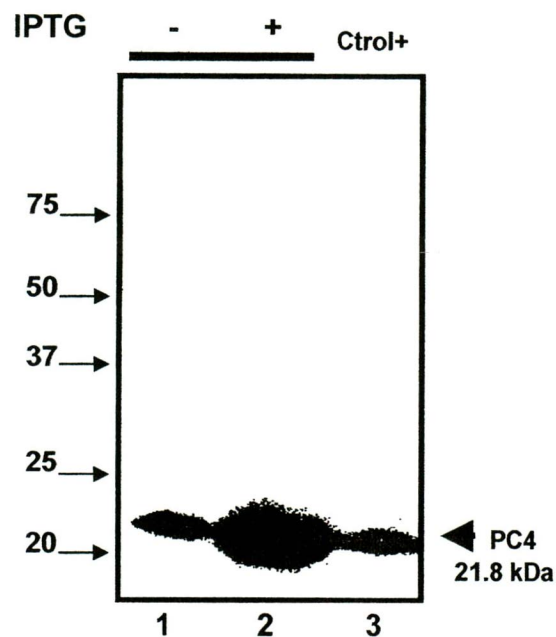


Figura 23. Expresión de rEhPC4 en cultivo masivo de *E. coli* BL21(DE3)pLysS inducido. Western blot del cultivo masivo de células BL21(DE3)pLysS transformadas con pRSET-*Ehpc4* e inducidas 3h con IPTG. Carril 1, extractos celulares sin inducir. Carril 2, Extractos celulares inducidos 3h. Carril 3, control positivo del Western, células BL21(DE3)pLysS pRSET-*Ehpc4* que expresan EhPC4. A la izquierda como referencia, el marcador de peso molecular. Se empleó como anticuerpo primario un α -6xHis 1:2000 y como secundario un anti-ratón peroxidado 1:1000. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.

La purificación de rEhPC4 se hizo por cromatografía de afinidad mediante el uso de una columna de Ni-NTA (sección 4.8). Durante la elusión el cromatógrafo pasó automáticamente por la columna concentraciones crecientes de imidazol, generándose un gradiente que iba de 0-500 mM, lo que permitió que las proteínas que se quedaron unidas a la columna después del lavado se despegaran de manera gradual, en base a su afinidad, de esta manera las proteínas con mayor afinidad por la columna eluyen a mayor concentración de imidazol. Durante la elusión, el cromatógrafo generó 37 fracciones de elusión y al mismo iba generando un gráfico de sus absorbancias contra el tiempo. En la **Figura 24** se muestra el electroferograma generado por el cromatógrafo con los resultados de la purificación, donde se observan una serie de picos de absorbancia (a los 32.7, 35.92 y 37.72 min) que representan las fracciones (de la 6 a la 14) con una mayor concentración de proteína. Estas fracciones fueron analizadas mediante un gel SDS-PAGE al 10 % para determinar la presencia y pureza de la proteína rEhPC4. En la **Figura 24** se muestra el gel teñido con azul de Coomasie. Las fracciones 6-10 que corresponden a las proteínas eluidas en el primer pico, contienen proteínas que se unieron de manera inespecífica a la columna. En el segundo pico, que abarca a las fracciones 11 y 12, se comienza a observar el enriquecimiento de una proteína del tamaño esperado para rEhPC4 (21.8 kDa). Sin embargo, en las fracciones 13 y 14 se observa la mayor concentración y pureza de esta proteína. En base al electroferograma, observamos que bajo estas condiciones de purificación, la proteína eluye entre una concentración de imidazol que va de los 275-340 mM. Las fracciones 13 y 14 se resolvieron en geles preparativos SDS-PAGE al 10%. En la **Figura 25** se muestra uno de éstos geles donde se observa una banda (carril 2) alrededor de 21.8 kDa, la cual se corto y electroeluyo para obtener aun más pura la proteína recombinante. Finalmente, la proteína se cuantificó por el método de Bradford, de la cual obtuvimos aproximadamente un volumen de 2 ml a una concentración de 5 µg/µl.

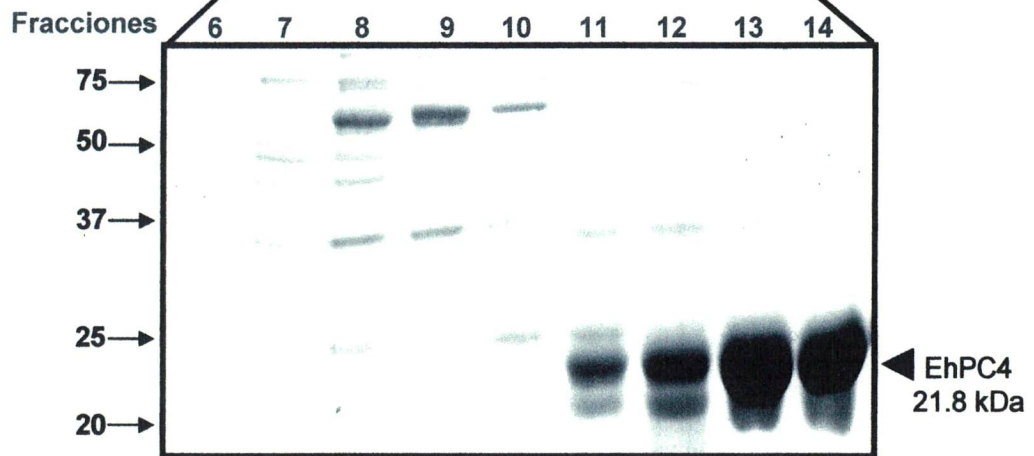
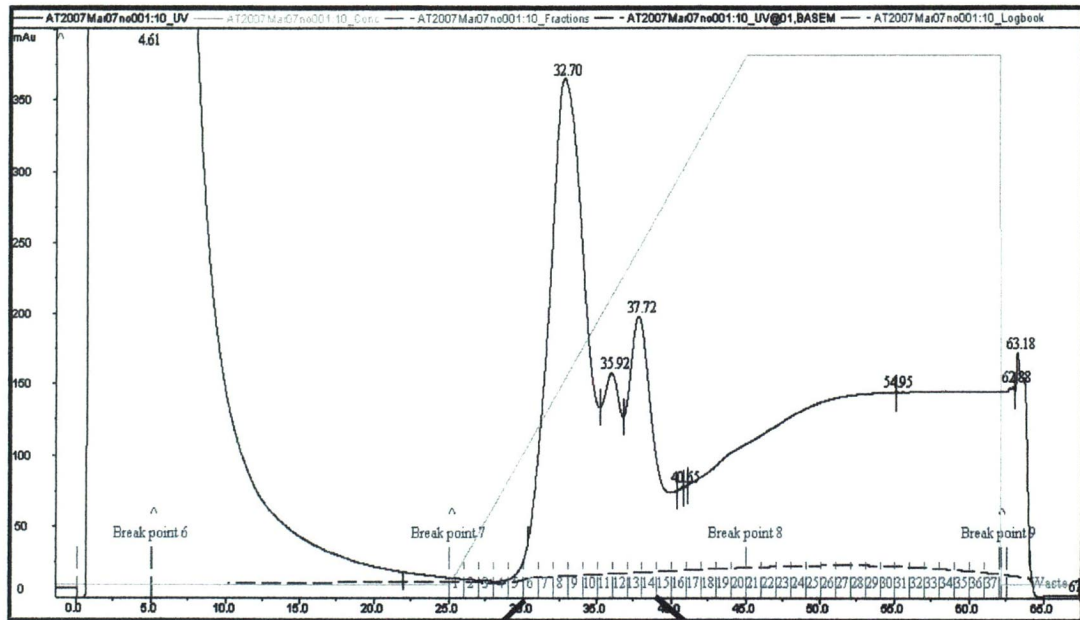


Figura 24. Purificación de rEhPC4 por columna de Ni-NTA. En el panel superior se muestra el electroferograma que arrojó el cromatógrafo durante la purificación de EhPC4, donde se grafica en azul la absorbancia de las muestras contra el tiempo, con números rojos se muestran las fracciones de elusión y en verde se grafica la concentración de imidazol aplicada a la columna. En el panel inferior se muestra un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie, donde se resolvieron las fracciones 6-14 de elusión generadas durante la purificación. Como referencia se muestra a la izquierda del gel el marcador de peso molecular.

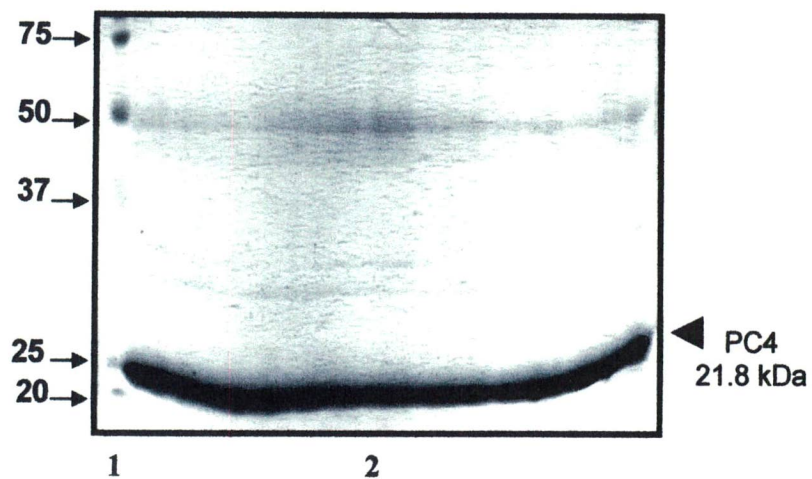


Figura 25. Gel preparativo SDS-PAGE al 10% para la electroelución de la proteína rEhPC4. Carril 1, 3µl de Marcador de peso molecular Dual-Color (Biorad). Carril 2, fracción de elusión de la proteína rEhPC4.

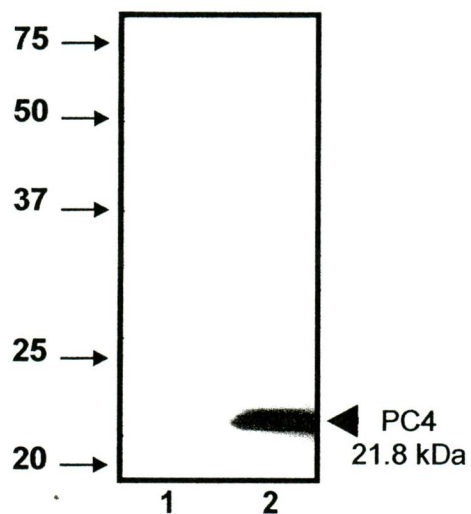


Figura 26. Western blot para verificar la identidad de la proteína rEhPC4 purificada. Carril 1, extractos de células *E. coli* BL21pLysS sin transformar ni inducir. Carril 2, 5 μg de la proteína rEhPC4 pura. Como anticuerpo primario se empleó un α -6xHis de ratón 1:1000 y como secundario un anti-ratón peroxidado 1:2000. A la izquierda se muestra como referencia el marcador de peso molecular. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.

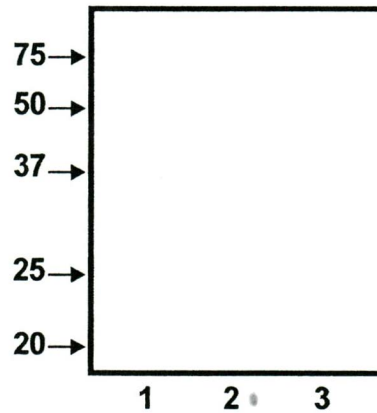
5. Generación de anticuerpos policlonales específicos para EhPC4.

Con la proteína recombinante rEhPC4 pura inoculamos un conejo siguiendo el protocolo de inmunización previamente establecido (sección 5.6). Posteriormente, probamos la reactividad y especificidad del suero preinmune e inmune, en extractos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS mediante Western blot.

En la Figura 27a se muestran los resultados del Western blot de extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS en diferentes condiciones incubados con el suero preinmune. Carril1, extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS; carril 2, extractos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-*Ehpc4* inducidos 3 h con IPTG; carril 3, 5 µg de rEhPC4 pura. Estos resultados muestran que el suero preinmune del conejo no reconoce ninguna proteína en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS sin transformar, ni en transformadas e inducidas y tampoco reconoce a la proteína recombinante pura.

En la Figura 27b se muestran los resultados del Western blot de extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS en diferentes condiciones incubados con el suero inmune. Carril1, extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)pLysS; carril 2, extractos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS pRSET-*Ehpc4* inducidos 3 h con IPTG; carril 3, 5 µg de rEhPC4 pura. Se observa que el suero inmune no reconoce alguna proteína en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS sin transformar, pero sí reconoce a una proteína del tamaño esperado para rEhPC4 (21.8 kDa) en células BL21(DE3)pLysS pRSET-*Ehpc4* inducidas 3h. Cuando el suero preinmune es probado contra la proteína recombinante pura, se detectan 2 bandas, una de aproximadamente 21.8 kDa que corresponde al peso esperado para la proteína rEhPC4 monomérica, y otra de aproximadamente 43.6 kDa que sugerimos corresponde a un dímero de la proteína, lo que nos sugiere que se está favoreciendo la dimerización de la proteína rEhPC4.

a)



b)

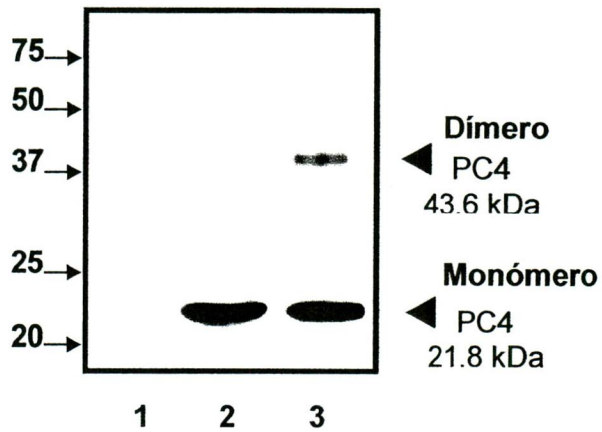


Figura 27. Western Blot de la proteína rEhPC4 con el suero preinmune e inmune anti-EhPC4. (a) Western blot con el suero preinmune. Carril 1, extractos celulares de *E. coli* BL21pLysS; Carril 2, extractos de *E. coli* BL21pLysS pRSET-Ehpc4 inducidos 3 h; Carril 3, 5 μ g de rEhPC4 pura. (b) Western blot con el suero inmune anti-EhPC4; Carril 1, extractos celulares de *E. coli* BL21pLysS; Carril 2, extractos de *E. coli* BL21pLysS pRSET-Ehpc4 inducidos 3 h; Carril 3, 5 μ g de rEhPC4 pura. A la izquierda, se muestra como referencia el marcador de peso molecular. Como anticuerpo primario se empleó el suero preinmune o inmune en una dilución 1:1000 y como anticuerpo secundario un anti-conejo peroxidado en una dilución 1:8000. La membrana se reveló mediante el sistema ECL.

6. Localización la proteína EhPC4 en extractos nucleares y citoplásmicos de *E. histolytica*.

Para determinar la localización de la proteína EhPC4 en trofozoítos HM1:IMSS de *E. histolytica*, primero obtuvimos extractos citoplásmicos y nucleares (ver 6.1). Para verificar la calidad de los extractos, éstos fueron resueltos en geles SDS-PAGE al 10% y posteriormente teñidos con azul de Coomasie. En la **Figura 28a** se muestran los resultados donde se puede observar que los extractos nucleares (EN) y citoplasmáticos (EC) presentan una buena integridad, esto es por la presencia de bandas bien definidas y de alto peso molecular.

Los extractos fueron analizados para determinar la localización de la proteína EhPC4. En la **Figura 28b** se muestran los resultados del Western blot donde resolvieron en el carril 1, 80 µg de EN y en el carril 2, 80 µg de EC, y se incubaron con suero preinmune (dilución 1:1000). Se observa que el suero preinmune no reconoce ninguna proteína en EN ni en EC. En la **Figura 28c** se muestran los resultados del Western blot donde resolvieron en el carril 1, 80 µg de EN y en el carril 2, 80 µg de EC, y se incubaron con suero inmune α-EhPC4 (dilución 1:1000). Se observa que el suero inmune no detecta a ninguna proteína en los EC; pero sí reconoce una en los EN de aproximadamente 21 kDa, y con menor intensidad otras que están entre el rango de 23 y 24 kDa. Nosotros sugerimos que todas ellas corresponden a la proteína EhPC4 con diferentes grados de modificación postraduccional.

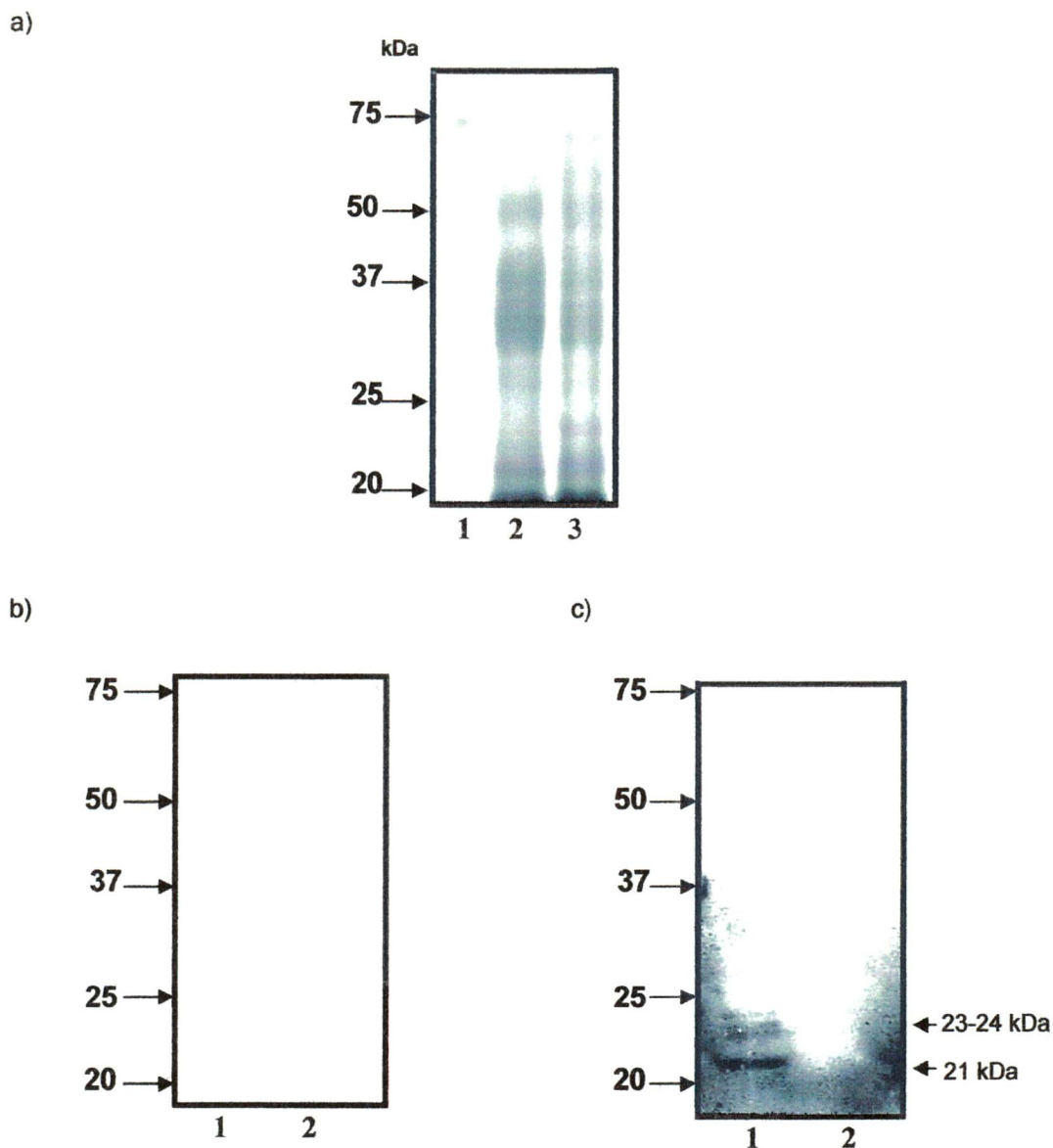


Figura 28. Localización de EhPC4 en extractos nucleares (EN) y citoplásmicos (EC) mediante inmunodetección. (a) Gel SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie; carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, EN; carril 3, EC. (b) Western blot con el suero preinmune; Carril 1, EN; carril 2, EC. (c) Western blot con el suero inmune anti-EhPC4; carril 1, EN; carril 2, EC. Como anticuerpos primarios se utilizaron el suero preinmune (b) ó inmune anti-EhPC4 (c) diluídos 1:1000 y como anticuerpo secundario un α -conejo peroxidado diluído 1:8000. Las membranas fueron reveladas empleando el sistema ECL.

7. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética para determinar la afinidad de la proteína rEhPC4 a dsDNA.

Para analizar la interacción de la proteína rEhPC4 con dsDNA, se obtuvo por PCR el fragmento de DNA de doble cadena empleado para el ensayo (sección 7.1.2). En la **Figura 29a** se esquematizan las características del fragmento de 174 pb de la región promotora del gen *Ehadh112* de *E. histolytica*, clonado en el plásmido p400CAT, el cual denominamos ds174. ds174 comprende de la posición -151 a la +24 y presenta dos sitios de inicio de la transcripción, uno de en la posición -151 y otro en la posición -69. Posteriormente, los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa y las bandas correspondientes al fragmento fueron purificadas (sección 7.1.2). En la **Figura 29b** se muestra el fragmento ds174 puro, el cuál resolvimos en un gel de agarosa 1% TAE 1X para verificar la calidad y cantidad del fragmento. Posteriormente, el fragmento ds174 fue marcado con α - 32 P[dATP] utilizando el *kit* comercial “*Prime-a-Gene® Labeling System*” (Promega). La sonda ds174 se purificó por columna de exclusión molecular y se cuantificó en un contador de centelleo (sección 7.1.2).

La proteína recombinante rEhPC4 que empleamos para los ensayos fue inducida en cultivos de *E. coli* BL21pLysS pRSET-*Ehpc4*, purificada por columna de Ni-NTA bajo condiciones nativas y cuantificada por espectrofotometría a A_{600} . La proteína purificada la obtuvimos en una concentración de 3 μ g/ μ l. Para los ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética, se prepararon las mezclas de reacción (sección 7.3) y se resolvieron en un gel nativo de poliacrilamida para DNA al 6%. Posteriormente, los geles fueron secados y expuestos a una placa sensible a radioactividad, la cuál fue posteriormente analizada para la determinación de la formación de complejos.

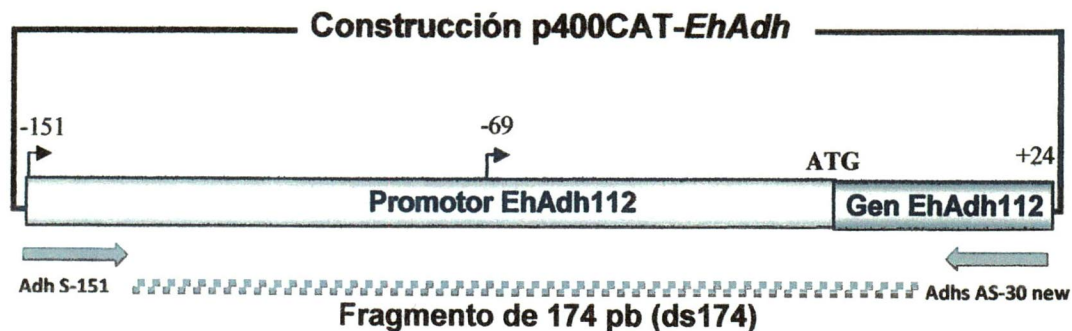
En la **Figura 30** se observan los resultados obtenidos del ensayo de retardamiento. En **30a** se emplearon 3 μ g de proteína rEhPC4 por reacción. En el carril 1 se observa la sonda libre; en el carril 2 donde se puso a interaccionar la sonda ds174 con rEhPC4, se observa la formación de dos complejos (C1 y C2), los cuáles desaparecen cuando se les adiciona el competidor específico, que corresponde al fragmento ds174 frío en un exceso molar de 50 veces (carril3). Cuando se adiciona la competencia inespecífica (un fragmento codificante del gen ribosomal de *E. histolytica*) en exceso molar, sólo permanece el complejo 2 (carril 4). En el carril 5 y 6

se resolvieron las reacciones de superretardamiento con 2 concentraciones diferentes de suero anti-PC4, 1 y 5 μ l, respectivamente, donde en ningún carril se observa algún efecto de superretardamiento. Al incubar la sonda ds174 con BSA (una proteína que no se une al dsDNA) no se observa la formación de ningún complejo ds174-BSA. En la figura 30b se emplearon 6 μ g de proteína por reacción, en donde se observan los mismos resultados.

Estos resultados sugieren que la interacción de ds174 con rEhPC4 forman un complejo (C2) específico y estable. El complejo C1 parece ser inespecífico, o bien, bajo estas condiciones de es menos estable.

Debido a que en las reacciones de superretardamiento no se observó ningún efecto, realizamos otro ensayo donde empleamos 6 μ g de la proteína rEhPC4 por reacción, e incrementamos la cantidad de suero anti-EhPC4 empleado. En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos. El carril 1 corresponde a la sonda ds174 libre, el carril 2 que corresponde a la sonda interaccionando con rEhPC4, se observa la formación de 2 complejos (C1 y C2). En los carriles 3, 4, 5 y 6 se puso a interaccionar la sonda ds174 con la proteína rEhPC4 y diferentes cantidades de suero inmune α -EhPC4 (5, 7.5, 10 y 12.5 μ l, respectivamente), en donde se observa la desaparición progresiva de los complejos conforme se va incrementando la concentración de suero α -EhPC4, éste efecto es más claro a partir de los 10 μ l. Sin embargo, no es clara la formación de un complejo de superretardamiento en el gel, esto puede deberse a que el complejo tripartita (ds174, rEhPC4 y α -EhPC4) pudiera estarse quedando sin resolverse en el pozo del gel.

a)



b)

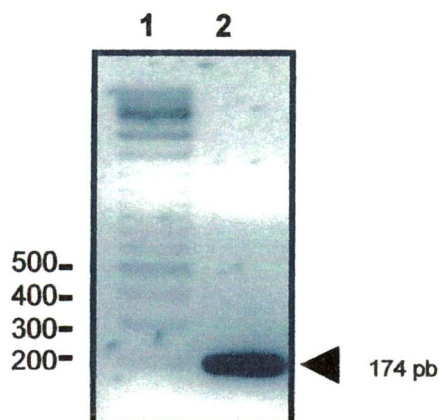


Figura 29. Características del fragmento ds174 empleado para los ensayos de retardamiento. (a) Esquematación del fragmento de ds174 del promotor del gen *Ehadh112* clonado en el plásmido p400CAT, el cuál comprende de la posición -151 a la +24 y presenta dos sitios de inicio de la transcripción, uno de en la posición -151 y otro en la posición -69; las flechas rojas indican las regiones de alineamiento de los oligonucleótidos empleados para su amplificación por PCR. (b) Gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X teñido con bromuro de etidio; Carril 1, Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 2, 500 ng del fragmento ds174 purificado.

a)

b)

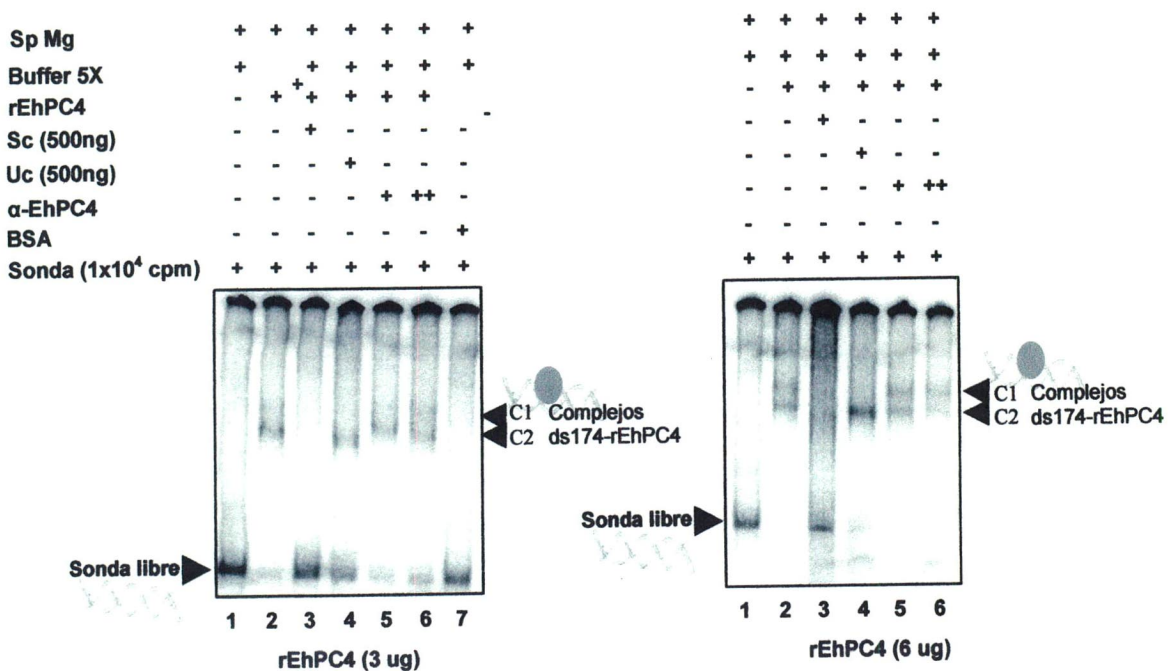


Figura 30. Ensayo de retardamiento de la movilidad electroforética. (a) Ensayo de retardamiento empleando 3 µg de proteína por reacción; Carril 1, sonda libre; Carril 2, complejo ds174-rEhPC4; Carril 3, competencia específica; Carril 4, competencia inespecífica. Carriles 5 y 6, reacciones de superretardamiento con 1 y 5 µl de suero anti-EhPC4; Carril 7, 3 µg de BSA. (b) Ensayo de retardamiento empleando 6 µg de proteína por reacción, el orden de las reacciones es idéntico al del gel (a).

Sp	+	+	+	+	+	+
Buffer	+	+	+	+	+	+
rEhPC4	-	+	+	+	+	+
α -EhPC4	-	-	+	+	+	+
Sonda (2×10^4)	+	+	+	+	+	+

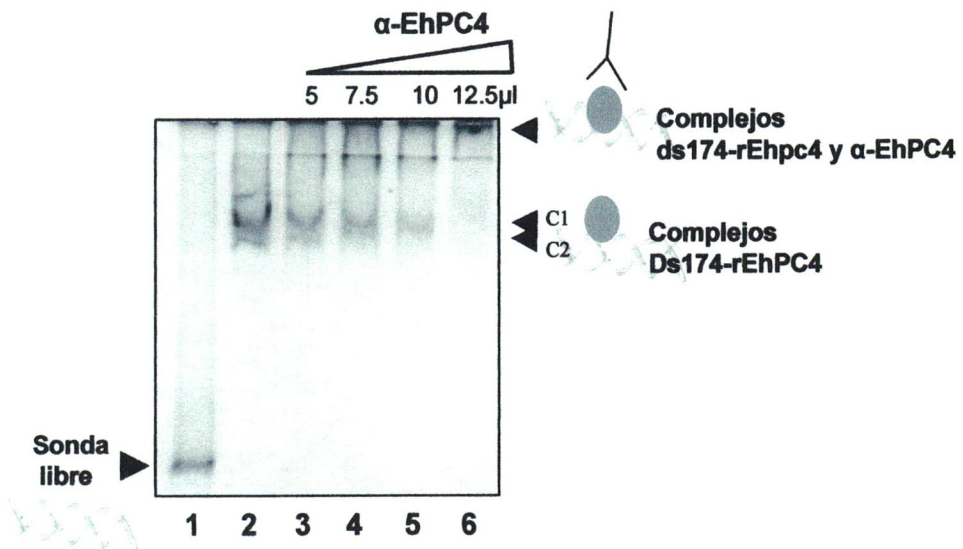


Figura 31. Ensayo de superretardamiento. Carril 1, sonda libre; Carril 2, complejo ds174-rEhPC4; Carriles 3 al 6, reacciones de superretardamiento con 5, 7.5, 10 y 12.5 μ l de suero anti-EhPC4, respectivamente.

VI. DISCUSIÓN.

La transcripción de los genes eucariontes es un evento nuclear que permite pasar la información que se encuentra en el genoma, almacenada en una de las dos cadenas del DNA, a una molécula de RNA que actúa como portadora del mensaje genético. A ésta molécula se le ha denominado mRNA o RNA mensajero. De manera co-transcripcional, el mRNA debe de pasar por una serie de modificaciones químicas conocidas en su conjunto como mecanismos de procesamiento del pre-mRNA, como como son el “capping”, el “splicing” y el corte/poliadenilación, que le permiten ser más estable, exportarse del núcleo, y en el citoplasma ser reconocida por los ribosomas y servir como templatado para la síntesis de proteínas.

Se sabe que la maquinaria de transcripción está acoplada con las maquinarias del procesamiento del pre-mRNA, gracias a la presencia de factores compartidos que van a estar participando en los diferentes eventos. Uno de estos factores es PC4 de humano (por sus siglas en inglés, Positive Coactivator 4), que se propuesto como una proteína que permite el acoplamiento entre el inicio y la terminación de la transcripción, con el corte y la poliadenilación. PC4 inicialmente fue descrita como una proteína coactivadora de la transcripción, sin embargo, se ha propuesto que tiene un papel importante en el procesamiento del extremo 3´ de los pre-mRNA (Calvo O. y James Manley, 2001). El acoplamiento de las maquinarias permite resolver muchos problemas inherentes a las vías de la expresión génica, haciendo más eficientes los procesos.

En *E. histolytica*, patógeno humano que produce la enfermedad conocida como amibiasis, se conoce muy poco acerca de los factores que conforman las maquinarias de transcripción y del procesamiento del pre-mRNA. Desde hace tiempo nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en estudiar los factores que participan en el corte y la poliadenilación de los pre-mRNA´s en *E. histolytica*. En el 2005 se identificó una secuencia que hipotéticamente codifica para un homólogo de PC4 (C. López-Camarillo y cols., 2005), el cuál se ha denominado *Ehpc4*. En el 2007, mediante microarreglos se observó que dicho gen se sobreexpresaba 2.2 veces más en trofozoítos virulentos, en comparación con no virulentos (Santi-Roca y cols., 2007), lo que nos sugiere que su producto, la proteína EhPC4, probablemente está

participando en la transcripción y procesamiento de los pre-mRNAs de genes relacionados con virulencia.

En el presente trabajo realizamos una caracterización *in silico* y molecular de la proteína EhPC4. Mediante un blast en las bases de datos del genoma de *E. histolytica* y usando como sonda a PC4 de humano, nosotros detectamos al posible homólogo de PC4 en ameba, EhPC4, con un valor de $E = 1.6 \times 10^{-10}$, y porcentajes de identidad y similitud del 25 % y 53 %, respectivamente. Estos datos apoyan la existencia de homología entre PC4 y EhPC4, ya que como regla general, se considera que un porcentaje de identidad del 25 % entre proteínas de 100 aa o más y un valor de $E < 0.02$, es estadísticamente significativo, lo que indica que existe una alta probabilidad de homología entre ellas (J. Pevsner, 2003; Pearson W., 1996).

Una manera indirecta de intuir si una proteína es de importancia biológica es determinando la existencia de proteínas ortólogas en diferentes organismos. Nosotros encontramos varias proteínas conservadas que hipotéticamente son coactivadores de la RNA pol II, en organismos que se encuentran distribuidos a lo largo de la escala evolutiva de los eucariontes, y las cuales muy probablemente son ortólogas de EhPC4, lo que nos sugiere que EhPC4 puede ser un posible coactivador transcripcional y tener una función importante dentro de las células. Esta idea es apoyada por el hecho de haber encontrado en nuestras predicciones dos dominios conservados, sobrelapados en la región C-terminal de la proteína, uno denominado PC4 y otro de unión a ssDNA, los cuales se saben que están presentes en su homóloga PC4 y que son importantes para su capacidad coactivadora.

Debido al alto grado de similitud en la estructura secundaria y terciaria del CTD-EhPC4 con las del CTD-PC4, así como en los aminoácidos que se han reportado que están implicados en la interacción DNA-PC4 (Werten Sebastiaan y Moras Dino, 2006), nosotros pensamos que EhPC4 potencialmente puede unirse al DNA y tener una función similar a PC4.

Se sabe que PC4 es una proteína que regula su función mediante la fosforilación de algunos de sus residuos de aminoácidos. El grado de fosforilación de PC4 determina la función que realiza dentro de la célula en determinado momento. Se ha reportado que las cinasas CKII y PKC pueden modificar a PC4 *in vitro*. Mediante análisis mutacionales y de espectrometría de masas, se ha visto que PC4 puede hiperfosforilarse *in vivo* en su región N-

N-terminal y que esto puede deberse principalmente a la acción de CKII (Hui G. E. y cols., 1994). Es interesante haber encontrado en la predicción de nuestros análisis bioinformáticos que la secuencia de EhPC4 presenta sitios potenciales para el reconocimiento de CKII, PKC y TYR, lo que nos hace suponer que EhPC4 en *E. histolytica* también podría ser modificada por esta cinasa u otras y regular de ésta manera su función dentro de la célula.

Para la caracterización molecular de EhPC4, nosotros logramos clonar el gen *Ehpc4* en marco de lectura en el vector de expresión pRSET-A, el cuál fue secuenciado para verificar su secuencia y compararla con la que se encuentra reportada en las bases de datos. Ambas secuencias resultaron ser idénticas a nivel de aminoácidos y de nucleótidos.

La construcción pRSET-*Ehpc4* nos permitió transformar células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e inducir la expresión de la proteína recombinante con la adición de IPTG. La expresión de la proteína en este sistema se observó a nivel basal, e incrementó su concentración a las 3 y 6 horas de haber adicionado el inductor IPTG. Nosotros no observamos diferencias en la expresión de la proteína entre las 3 y 6 horas de inducción. rEhPC4 presenta un peso de 21.8 kDa, 3.8 kDa más que la proteína nativa, esto por la adición de la etiqueta 6xHis en su extremo N-terminal.

Como nos interesaba obtener a la proteína en grandes cantidades para inocular un conejo y así generar anticuerpos policlonales específicos para EhPC4, realizamos una inducción masiva de la proteína en células *E. coli* BL21(DE3)pLysS con IPTG durante 3 h, la cuál posteriormente purificamos por cromatografía de afinidad en columna. Antes de purificar, un ensayo de solubilización de la proteína rEhPC4 nos demostró que ésta se encontraba en la fracción soluble en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, esto nos permitió determinar que su purificación podía hacerse bajo condiciones nativas. En base a los resultados determinamos que, bajo las condiciones de purificación trabajadas, la proteína eluye entre una concentración de imidazol que va de los 275-340 mM.

Mediante electroelusión, logramos obtener la proteína rEhPC4 con mayor pureza, a una concentración de 5 µg/µl, la cual es reconocida de manera específica por anticuerpos contra la etiqueta de histidina.

Mediante Western blot, nosotros observamos que los anticuerpos generados fueron de buena calidad y reactividad, reconocieron de manera específica a la proteína en extractos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformados con pRSET-*Ehpc4* e inducidos con IPTG. Mientras que el suero pre-inmune no. Sin embargo, cuando los probamos con la proteína recombinante pura, observamos 2 bandas, una que cae dentro del peso

esperado para la proteína rEhPC4 monomérica (21.8 kDa), y otra que está dentro del peso esperado para su forma dimérica (43.6 kDa), lo que nos sugiere que la proteína tiene la capacidad de dimerizarse cuando ésta es almacenada por alrededor de 4 semanas. Esto no es sorprendente, debido a que se ha reportado que la proteína PC4 puede formar dímeros. Para probar que efectivamente la banda corresponde a un dímero, se puede resolver la proteína recombinante en geles desnaturalizantes con agentes reductores como Urea al 8 M y β -mercaptoetanol al 8%, lo que se espera es que, bajo estas condiciones, la banda de 43.6 kDa desaparezca.

Cuando los anticuerpos son probados con extractos citoplásmicos y nucleares de trofozoítos de *E. histolytica*, los anticuerpos α -EhPC4 reconocen una proteína alrededor de 21 kDa y varias entre 23 y 24 kDa en extractos nucleares, no así en extractos citoplasmáticos, esto es de esperarse para una proteína que lleva a cabo su función en el núcleo, como son los factores de transcripción y de procesamiento del pre-mRNA. Nosotros sugerimos que esa proteína corresponde a EhPC4 con diferentes grados de modificación post-traducciona.

Los ensayos de retardamiento sugieren que EhPC4 tiene la capacidad de unirse a la sonda ds174 de manera específica, debido a que se observa la formación de 2 complejos EhPC4-dsDNA, los cuáles desaparecen cuando se adiciona el competidor específico que corresponde al fragmento ds174 en un exceso molar, y uno de ellos desaparece (C1) cuando se adiciona el competidor inespecífico en exceso. Por lo tanto, el complejo C2 parece ser más específico o más estable que C1 bajo las condiciones en que se trabajaron. La formación de dos complejos puede deberse a que la proteína rEhPC4 reconoce diferentes regiones dentro de la sonda ds174, y por lo tanto se forman complejos con diferentes tasas de movilidad electroforética. Debido a que la sonda ds174 presenta dos sitios de inicio de la transcripción, probablemente, el complejo C1 puede corresponder a la sonda ds174 unida a dos proteínas, y el complejo C2 a la sonda ds174 con una sola proteína unida. Aunque no logramos ver la formación de complejos de superretardamiento, los resultados sugieren que la proteína que se está uniendo a la sonda de DNA es rEhPC4, ya que cuando se incrementa la concentración del suero específico α -EhPC4, se van desapareciendo de manera gradual los complejos. Sin embargo, hacen falta más análisis para corroborar esto.

VII. APÉNDICE (soluciones).

Medio de cultivo

LB: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Agua c.b.p. 1 L. Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH. Se esteriliza por autoclave.

Amortiguador de carga para proteínas (2X)

Tris-HCl 100 mM, 4 % de SDS (p/v), 20 % de glicerol, 2 % de 2-mercaptoetanol y 0.2 % de azul de bromofenol (p/v). Se ajusta el pH a 6.8.

Amortiguador de corrida para electroforesis de proteínas

Tris-base 0.025 M, glicina 200 mM y SDS 0.1%.

TAE (50X). 1L

242 g de Tris-base, 5,7 % de ácido acético glacial (v/v), 18.6 g de Na₂EDTA.2H₂O. Agua c.b.p. 1 L. Se ajusta el pH a 8.3.

TBE (10X)

Tris-base 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM y EDTA 0.9 mM.

TE

Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, se ajusta el pH a 8.0. Se esteriliza por autoclave.

Amortiguador de transferencia (1X)

Tris-HCl 25 mM, glicina 129 mM y metanol al 20 %.

Amortiguadores para la purificación de proteínas en estado nativo por cromatografía:

- Amortiguador A1 de unión: 20 mM de fosfato de sodio, 0.5 M de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7.4.

- Amortiguador B de elusión: 20 mM de fosfato de sodio, 0.5 M de NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7.4.

Amortiguadores para la obtención de extractos nucleares y citoplasmáticos:

- Amortiguador A: HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM y PMSF 0.5 mM.

- Amortiguador C: HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1mM.

Amortiguador para los ensayos de retardamiento:

- Amortiguador de unión 5X: HEPES pH 7.9 12 mM, KCl 60 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 4 mM, espermidina 4 mM y glicerol 10 %.

PBS pH 7.4

NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaH₂PO₄.12H₂O 10 mM y KCl 2.7 mM. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl.

Solución de Azul de Coomasie (1 L)

Coomasie R-250 al 0.25%, 500 ml de metanol y 70 ml de ácido acético. Agua c.b.p. 1L.

Solución desteñidota

Etanol 30 %, ácido acético 10 % y Agua bidestilada 60%.

Reactivo de Bradford

50 mg de Azul de Coomasie G-250, 25 ml de etanol al 100%, 50 ml de ácido fosfórico al 85 % y 500 ml de agua bidestilada. La solución se filtra con papel Whatman No. 1.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

A. Battacharya, S. Satish, Anindya Bagchi y S. Bhattacharya (2000). The genome of *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology*. Vol. 30, No. 4. pp 401-410.

A. B. Sachs, P. Sarnow and M. W. Hentze (1997). **Starting at the beginning, middle and end: Translation initiation in eukaryotes.** *Cell*, 89: 831-838.

A. Fukuda, Shigeki Tokonabe, Mitsuhiro Hamada, Masahito Matsumoto, Tohru Tsukui, Yasuhisa Nogi, and Koji Hisatake (2003). **Alleviation of PC4-mediated Transcriptional Repression by the ERCC3 Helicase Activity of General transcription Factor TFIIH.** *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 17, 14827-14831.

A. H. Knoll (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science*. 256: 622-627.

A. J. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart (2004). *A introduction to genetic analysis*. Edit. Freeman. 8ª Edición.

A. J. Shatkin and J. L. Manley (2000). The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.*, 7: 838-842.

A. Martínez-Palomo (1989). *The biology of Entamoeba histolytica*. Research studies Press. Jhon Wiley.

A. Martínez-Palomo (1987). The pathogenesis of amoebiasis. *Parasitol Today*. 3:111-118.

A. Parent, I. Benzaghoul, I. Bougie and M. Bisailon (2004). Transcription and mRNA Processing Events: the Importance of Coordination. *Journal of Biological Sciences* 4 (5): 624-637.

B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, U. C. Alsmark, J. Samuelson, P. Amedeo, P. Roncaglia, M. Berriman, R. P. Hirt, B. J. Mann, T. Nozaki, B. Suh, M. Pop, M. Duchene, J. Ackers, E. Tannich, M. Leippe, M. Hofer, I. Bruchhaus, U. Willhoeft, A. Bhattacharya, T. Chillingworth, C. Churcher, Z. Hance, B. Harris, D. Harris, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, R. Squares, S. Whitehead, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, H. Norbertczak, C. Price, Z. Wang, N. Guillen, C. Gilchrist, S. E. Stroup, S. Bhattacharya, A. Lohia, P. G. Foster, T. Sicheritz-Ponten, C. Weber, U. Singh, C. Mukherjee, N. M. El-Sayed, W. A. Petri Jr., C. G. Clark, T. M. Embley, B. Barrell, C. M. Fraser, N. Hall (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*, *Nature*. Feb 24;433(7028):865-8.

B. Sepúlveda (1982). Amebiasis: host-pathogen biology. *Rev. Infect. Dis.* 4: 836-842.

C. A. Beelman and R. Parker (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*, 81: 179-183.

C. A. Gilchrist, C. F. Holm, M. A. Hughes, J. M. Schaeffer, B. J. Mann y W. A. Petri, Jr. (2001). **Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3**

sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. The Journal of biological chemistry. Vol 276, No. 15, pp 11838-11843.

C. G. Clark (1999). The effect of secondary loss on our views of eukaryotic evolution. *Bid. Bull.* 196: 385-388.

C. G. Clark y L. S. Diamond (1997). Intraspecific variation and phylogenetic relationship in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. *J. Euk. Microbial.* 44: 142-154.

C.G. Clark, U.C.M. Alsmark, M. Tazreiter, Y. Saito, Nakano, V. Ali, S. Marion, C. Weber, C. Mukherjee, I. Bruchhaus, E. Tannich, M. Leippe, T. Sicheritz-Ponten, P.G. Foster, J. Samuelson, C.J. Noël, R.P. Hirt, T.M. Embley, C.A. Gilchrist, B.J. Mann, U. Singh, J.P. Ackers, S. Bhattacharya, A. Bhattacharya, A. Lohia, N. Guillén, M. Duchêne, T. Nozaki and N. HallC (2007). Structure and Content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in Parasitology*, Volume 65, páginas 51-190.

C. López-Camarillo, E. Orozco, L. A. Marchat (2005). *Entamoeba histolytica*: Comparative genomics of the pre-mRNA 3' end processing machinery. *Experimental Parasitology* 110, 184-190.

Conde-Bonfil, M. C. y De la Mora Zerpa, C. (1992). *Entamoeba histolytica*: a standing threat. *Salud Pública, México.* 34: 335-341.

G. Bird, Diego A. Zorio and David L. Bentley (2004). RNA polymerase II Carboxy-Terminal Domain Phosphorylation is required for Cotranscriptional Pre-mRNA splicing and 3' end formation. *Molecular and Cellular Biology.* Vol. 24, No. 20, 8963-8969.

G. de Dios-Bravo, J. P. Luna-Arias, A. M. Riverón, J. Olivares-Trejo, C. López-Camarillo, E. Orozco (2005). *Entamoeba histolytica* TATA-box binding protein binds to different TATA variants in vitro. *FEBS Journal* 272 1354-1366.

G. E. Hui, Y. Zhaot, B. T. Chait and R. G. Roeder (1994). Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 91, 12691-12695.

G. Ramakrishnan, C. A. Gilchrist, H. Musa, M. S. Torok, P. A. Grant, B. J. Mann and W. A. Petri (2004). Histone acetyltransferases and deacetylase in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 138. pp. 205-216.

J. A. Walsh (1988). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* 8, 228-238.

J. Brandsen, S. Werten, P. C. van der Vliet, M. Meisterernst, J. Kroon, and P. Gros (1997). C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site. *Nat. Struct. Biol.* 4:900-903.

- J. Fernández Retana (2007). Tesis de Maestría "Estudio Molecular y funcional del factor de corte del pre-mRNA, EhCF Im²⁵ de *Entamoeba histolytica*". ENMyH-IPN.
- J. García-Vivas, C. López-Camarillo, E. Azuara-Liceaga, E. Orozco and L. A. Marchat (2005). *Entamoeba histolytica*: Cloning expression of the poly(A) polymerase EhPAP. *Experimental Parasitology* 110, 226-232.
- J. I. Ravdin, M. Petri, Jr. (1988). Mechanisms of adherence by *Entamoeba histolytica*. En: Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin (ed.) John Wiley and Sons. EUA. p. 205-218.
- J. M. Schaenman, C. A. Gilchrist, B. J. Mann y W. A. Petry Jr. (2001) Identification of two *Entamoeba histolytica* sequence-specific URE4 enhancer-binding Proteins with homology to the RNA-binding motif RRM. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, pp 1602-1609.
- J. O. Corliss (1987). Protistan phylogeny and eukaryogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 100: 319-370.
- J. Pevsner (2003). *Bioinformatics and functional genomics*. Editorial Wiley-Liss. 792 páginas
- J. Santi-Roca, C. Weber, G. Guigon, O. Sismeiro, J. Coppé and N. Guillén (2007) The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis. *Cellular Microbiology*. Vol. 10, No. 1. pp 202-217.
- J. Zhao, Linda Hyman and Claire Moore (1999). Formation of mRNA 3' ends in Eukaryotes: Mechanism, regulation and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. Vol. 63, No. 2, 405-445.
- K. S. Kabnick y D. A. Peattie (1991). *Giardia*: a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *Amer. Sci.* 79: 34-43.
- L. A. Marchat, C. Gómez, D. G. Pérez, C. López y E. Orozco. Possible role of the CCAAT/Enhancer Binding Protein in the expression regulation of the *EhPgp1* multidrug resistance gene in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 2000 Jul-Aug; 31 (4 Suppl):S291-3.
- L. Mendoza, E. Orozco, M. A. Rodríguez, G. García-Rivera, T. Sánchez, E. García and P. Gariglio (2003). EhP53, an *Entamoeba histolytica* protein, ancestor of the mammalian tumor suppressor p53. *Microbiology* 143, pp. 885-893.
- M. Ares, Jr. and Nick J. Proudfoot (2005). Meeting Review The Spanish Connection: Transcription and mRNA Processing Get Even Closer. *Cell*, Vol. 120, 163-166.
- M. Hasegawa, T. Hashimoto, J. Adachi, N. Iwabe y T. Miyata (1993). Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.* 36: 380-388.

- M. L. Sogin (1989). Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am. Zool.* 29: 487-499.
- M. Sánchez-Guillén, Pérez-Fuentes, Salgado-Rosas, Ruíz-Argüelles, J. Ackers, A. Shire and Talamás-Rohana (2002). Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(6), pp. 731-737.
- N. L. Henry, D. A. Bushnell and R. D. Kornberg (1996). A yeast transcriptional stimulatory protein similar to Human PC4. *The Journal of biological chemistry*. Vol 271, No. 36, 21842-21847.
- O. Calvo and J. L. Manley (2001). Evolutionary conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol. Cell.* 7(5): 1013-1023.
- O. Calvo and J. L. Manley (2003). Strange bedfellows: polyadenylation factors at the promoter. *Genes and Dev.* 17: 1321-1327.
- O. Fisher, R. Siman-Tov and S. Ankri (2004). Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmet) in the protozoan parasite *E. histolytica*. *Nucleic Acids Research*. Vol. 32, No. 1, pp. 287-297.
- P. Cramer (2004). Recent structural studies of RNA polymerases II and III. *Biochemical Society Transactions*. Volume 34, part 6.
- R. A. Hendrik J., R. W. Wechselberger, R. Boelens, R. Kaptein, and G. E. Folkers (2006). The intrinsically Unstructured Domain of PC4 Modulates the Activity of the Structured core through Inter- and Intramolecular Interactions. *Biochemistry*, 45 (15), 5067-5081.
- R. López Revilla y R. Gómez (1978) *Entamoeba histolytica*, *E. invadens* and *E. moshkovskii*: fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol* 44: 243-248.
- S. Buratowski (2003). The CTD code. *Nature structural biology*. Vol. 10, Number 9.
- S. Werten and D. Moras (2006). A global transcription cofactor bound to juxtaposed strands of unwound DNA. *Nature struct. and molec. Biol*, Vol. 13, No. 2.
- S. Wertern, G. Stelzer, A. Goppelt, F. M. Langen, P. Gros, H. T. Timmers, P. C. Nan der Vliet and M. Meisterernst (1998). Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *The EMBO Journal*, Vol. 17, No. 17, 5103-5111.
- S. Werten, R. Wechselberger, R. Boelens, P. C. van der Vliet and R. Kaptein (1999). Identification of the single-stranded DNA binding surface of the transcriptional coactivator PC4 by NMR. *The Journal of Biological chemistry*. Vol. 274, No. 6, 3693-3699.

T. Bakker-Gunwald, T. Y., Wotsman, C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitology Today*. 9: 27-31.

T. Cavalier-Smith, T. A. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73: 203-266.

T. Koichiro, J. Dudley, N. Masatoshi and K. Sudhir (2007). MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8): 1596-1599

T. Maniatis and R. Reed (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 4;416(6880):499-506.

W. S. Klug, M. R. Cummings and C. A. Spencer (2006). *Conceptos de Genética*. Edit. Pearson Alhambra. 8ª Edición.

W. R. Pearson (1996). Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol.* 226: 227-58.

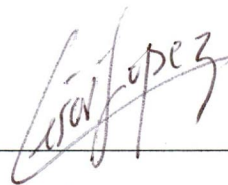
Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

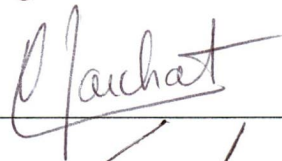
Nada Humano me es ajeno

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 19 de Febrero del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biol. Olga Nohemí Hernández de la Cruz.

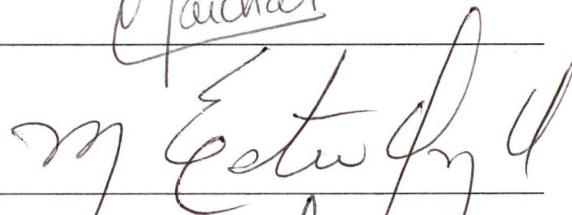
Dr. Mario César López Camarillo



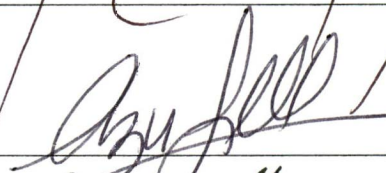
Dra. Laurence A. Marchat Marchau



Dra. María Esther Orozco Orozco



Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga



M. en C. Mavil López Casamichana



Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D. F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.