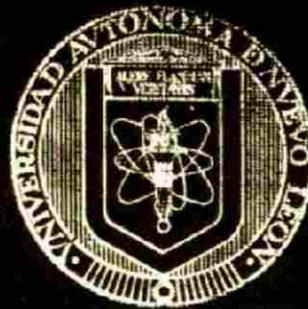


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



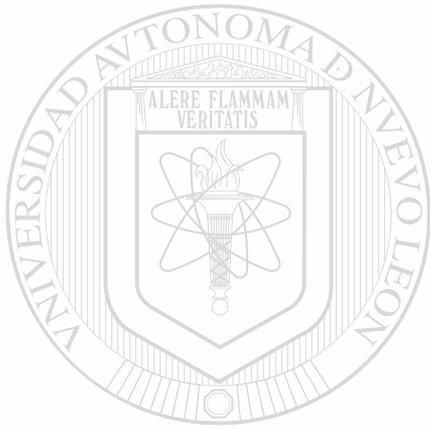
QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:
CLONACION Y ANALISIS DE LA
ESTRUCTURA PRIMARIA

POR:

EDUARDO CAMPOS GONGORA

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS en el área de Microbiología

Octubre, 2002



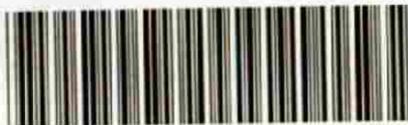
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

QUITINA SINTASAS DE Entamoeba histolytica:
EDUARDO CAMPOS GONGORA

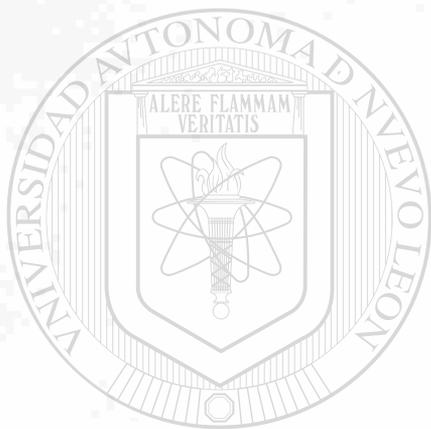
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
RC121
.A5
C36
2002
c.1



1080124469



UANL

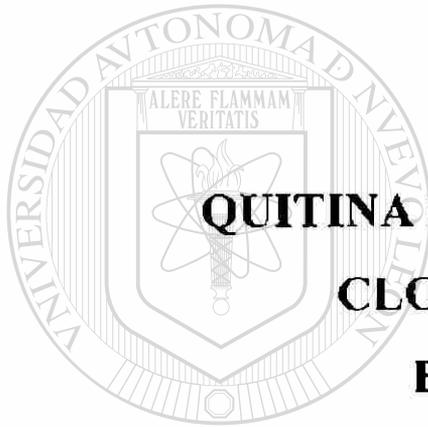
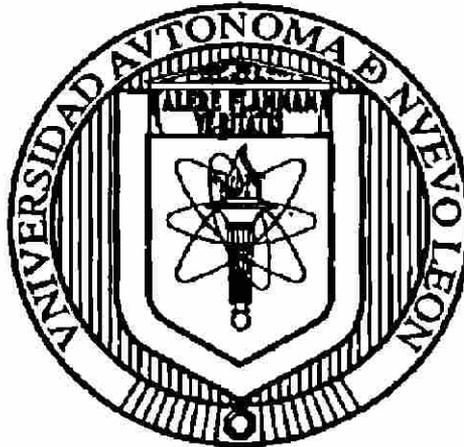
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:
CLONACION Y ANALISIS DE LA
ESTRUCTURA PRIMARIA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR

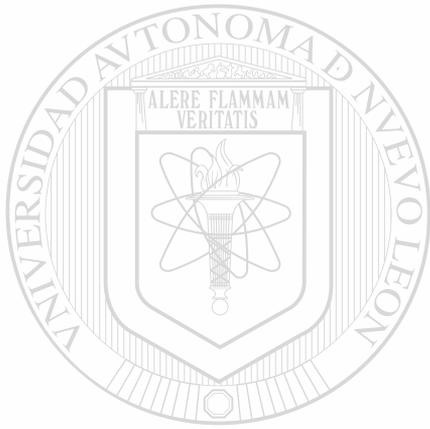
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EDUARDO CAMPOS GÓNGORA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS en el área de
Microbiología

Octubre, 2002

TD
RC121
.A5
C36
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

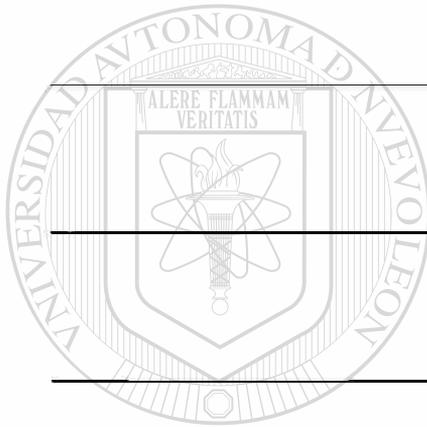
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:
CLONACION Y ANALISIS DE LA ESTRUCTURA
PRIMARIA**

Aprobación por Comité de Tesis.





Dr. Salvador Said Fernández
Presidente



Dr. Juan Manuel Alcocer
Secretario



Dra. Adriana Elizondo Herrera
Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



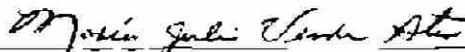
Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta

Vocal

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dra. Agnès Revol de Mendoza
Vocal



Dra. Maria Julia Verde Star
Subdirectora de Estudios de Postgrado

El presente trabajo se realizó en:

Departamento de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical "Bernhard Nocht"; Hamburgo, Alemania.

División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS.

Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL.

Director de Tesis:

Dr. Salvador Said Fernández

Centro de Investigación Biomédica del Noreste: IMSS.

Director de Tesis:

Dr. Prof. Egbert Tannich

Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin; Hamburg, Alemania.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Asesores:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Ute Willoeft

Departamento de Parasitología Molecular: Bernhard Nocht Institut.

Dra. Agnès Revol de Mendoza

Departamento de Bioquímica, Fac.de Medicina; UANL

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina; UANL

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Salvador Said Fernández**, por darme la confianza y apoyo necesarios para realizar el presente trabajo. Gracias por su apoyo y ayuda en los momentos difíciles pero sobretodo, gracias por su amistad a lo largo de estos 10 años de trabajo en la investigación científica.

Al **Dr. Egbert Tannich** quien además de brindarme el apoyo necesario para realizar este trabajo en su laboratorio, ha compartido parte de sus conocimientos conmigo. De manera especial agradezco también su amistad, ayuda y consejos para el futuro.

A todos mis compañeros del Bernhard Nocht Institut: **Egbert Tannich, Sassia Touzni, Félix Asche, Ina Hennings, Heidrun Buss, Ute Willoeft, Hanna Lotter, Frank Ebert, Andreas Krugger, Iris Bruchhaus, Mattias Leipe, Britta, Susan, die Kleine Maicke, die Grosse Maicke, Nicolas, Simone, Kerstin**, por todos esos momentos compartidos, inolvidables... gracias también por la paciencia que tuvieron para aceptar y corregir mis deficiencias del idioma alemán; especialmente tú, Sassia.

y a todos mis compañeros de otros laboratorios del BNI y personal administrativo que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo requerido.

A la **Dra. Adriana Elizondo Herrera** por sus consejos y ayuda para emprender esta maravillosa aventura. Gracias por tu amistad...

A los Drs. **Herminia G. Martínez Rodríguez, Agnès Revol de Mendoza, Adriana Elizondo Herrera, Juan Manuel Alcocer y Mario R. Morales Vallarta** por la revisión y sugerencias para incrementar la calidad de este trabajo.

Al Departamento de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste:IMSS y a la ULIEG del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL; por todo el apoyo y las facilidades otorgadas para realizar este trabajo de investigación en sus etapas iniciales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la UANL y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) porque gracias a las becas otorgadas he podido cumplir los objetivos planteados.

Y nuevamente, un agradecimiento especial para mi hermano Ricardo Zavala Góngora por que con su ayuda, consejos y apoyo en todo momento, logra que las cosas difíciles se hagan fáciles.

A mi familia por el apoyo y estímulo que siempre me han brindado, particularmente a mi madre Sra. Sabina Góngora Cerecedo, a mi hermana, su esposo e hijos, por permitirme estar lejos de Ustedes.

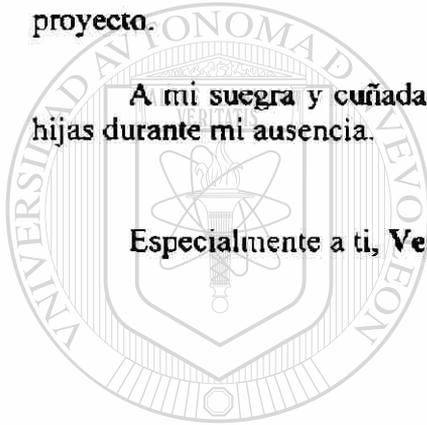
A la familia Muñoz- (Juan, Ana, Ale, Ana Karen) por su incondicional amistad, por el apoyo y ayuda que me brindaron para hacer más placentera mi estancia en Hamburgo al lado de mi familia.

A Enrique Martínez y su esposa, por la amistad que nos une y por su ayuda.

A la familia Lozano-Estrella por su amistad y ayuda prestada para culminar este proyecto.

A mi suegra y cuñadas por aceptar la responsabilidad del cuidado de mi esposa e hijas durante mi ausencia.

Especialmente a ti, Vera... por darme todo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas que forman la esencia de mi Universo y mi razón de ser:

A mi madre:

Sabina Góngora Cerecedo; a quien debo todo lo que soy, y que constituye mi mejor ejemplo a seguir.

A mi esposa:

Vera González Hernández; quien con su amor, comprensión y apoyo, me ha impulsado a extender las alas para intentar volar.

A mis hijas:

Miranda y Arantza; a quienes, en mi afán por alcanzar este objetivo, he limitado los momentos de convivencia juntos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A mis hermanos:

Ricardo y Margarita, y a sus respectivas familias.

A mí,

porque soy el centro de mi Universo...

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	
1.1	Amibiasis	1
1.2	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i>	1
1.3	Desenquistamiento	2
1.4	Enquistamiento	3
1.5	Estructura del quiste	5
1.6	Síntesis de pared en Entamoeba	6
1.7	Quitina	6
1.8	Síntesis de quitina	9
1.9	Quitina sintasas	10
1.10	Clonación y caracterización de genes de quitina sintasas	13
1.11	Quitina sintasa y síntesis de quitina en <i>E. invadens</i> y <i>E. histolytica</i>	14
1.12	Modelo actual de la síntesis de pared en <i>E. invadens</i>	16
1.13	Justificación	17
1.14	Hipótesis	18
1.15	Objetivos	18
1.15.1	Objetivo general	18 [®]
1.15.2	Objetivos específicos	18
2	MATERIAL	
2.1	Origen de los reactivos	20
2.1.1	Reactivos químicos	20
2.1.2	Enzimas e inhibidores	21
2.1.3	Reactivos inmunológicos	21
2.1.4	Marcadores	21
2.1.5	Otros materiales	22

2.2	Material Biológico	23
2.2.1	Amibas	23
2.2.2	Bacterias	23
2.2.3	Vectores de clonación	24
2.2.3.1	PCR [®] 2.1 (TOPO [™] TA Cloning Kit, Invitrogen)	24
2.2.3.2	pBK-CMV	25
2.2.4	Vectores de expresión	25
2.2.4.1	pJC45	25
2.2.4.2	pHisT7	25
2.2.5	Bibliotecas de DNA genómico construidas en el bacteriófago λ	26
2.2.5.1	Biblioteca de DNA de <i>Entamoeba histolytica</i> construida en el bacteriófago lambda ZAP [®] Express (Stratagene)	26
2.2.5.2	Biblioteca de DNA de <i>Entamoeba invadens</i> construida en el bacteriófago λ EMBL 4	27
2.3	Composición y preparación de los medios de cultivo	28
2.3.1	Medio TYI-S-33	28
2.3.2	Medio I.G (TYI-S33 sin Glucosa)	28
2.3.3	Medio LB y LB-Agar	29
2.4	Composición y preparación de las soluciones	29
2.4.1	Soluciones estándar	29
2.4.2	Soluciones amortiguadoras	30

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3 MÉTODOS

3.1	Cultivo de Amibas	35
3.1.1	Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> , cepa HM-1:IMSS	35
3.1.2	Cultivo de <i>Entamoeba invadens</i> , cepa IP-1	35
3.2	Enquistamiento	36
3.2.1	Enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	36
3.2.2	Enquistamiento de <i>E. invadens</i>	36
3.3	Extracción de DNA genómico de amibas	37

3.4	Análisis de secuencias de quitina sintasas reportadas en los bancos de datos. Identificación de secuencias consenso	38
3.5	Diseño de los iniciadores (oligonucleótidos)	39
3.6	Reacciones de PCR con el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	39
3.7	Clonación de los productos de PCR en el vector PCR ^R 2.1 TOPO	40
3.8	Preparación y transformación de células calcio-competentes, cepas DH5 α y XLORL de <i>E. coli</i>	41
3.9	Selección y análisis de las clonas positivas	42
3.10	Reacciones de secuenciación de los fragmentos clonados	43
3.11	Análisis de las secuencias de DNA obtenidas	44
3.12	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> construida en el bacteriófago λ ZAP	45
3.12.1	Preparación de la bacteria XLI-Blue MRF ⁺	45
3.12.2	Titulación de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> construida en λ ZAP	46
3.12.3	Preparación de las placas para el tamizaje de la biblioteca	46
3.12.4	Preparación de las réplicas de las placas en membranas de nitrocelulosa (Transferencia del DNA)	46
3.12.5	Marcaje de la sonda de DNA con α ³² P dATP	47
3.12.6	Prehibridación de las membranas portadoras del DNA	48
3.12.7	Hibridación con la sonda radioactiva	49
3.12.8	Lavado y exposición de las membranas	49
3.12.9	Identificación y aislamiento de subpoblaciones de fagos	50
3.12.10	Aislamiento de clonas positivas de bacteriófagos	51
3.12.11	Escisión <i>in vivo</i> del vector pBK-CMV a partir de λ ZAP	51
3.12.12	Transformación de la cepa XLORL de <i>E. coli</i> con los plásmidos pBK-CMV portadores de la secuencia EhCHS de <i>E. histolytica</i>	51
3.12.13	Secuenciación y análisis de los fragmentos de DNA de <i>E. histolytica</i> obtenidos de λ ZAP	52
3.13	Ensayos tipo Southern blot	52
3.13.1	Digestión del DNA	52
3.13.2	Electroforesis del DNA	53
3.13.3	Transferencia del DNA	53

3.13.4	Hibridación tipo Southern blot	55
3.14	Ensayos tipo Northern blot	56
3.14.1	Obtención del RNA amibiano	56
3.14.2	Extracción del RNA	57
3.14.3	Preparación de las muestras de RNA	57
3.14.4	Separación del RNA por electroforesis	58
3.14.5	Transferencia del RNA	58
3.14.6	Hibridación tipo Northern blot	58
3.15	Ensayos de transcripción reversa	59
3.15.1	Obtención del RNA amibiano	59
3.15.2	Tratamiento del RNA con DNasa I	59
3.15.3	Síntesis de cDNA y reacciones de PCR	60
3.15.4	Terminación e inicio de la transcripción (RACE-PCR)	61
3.16	Clonación de los genes EhCHS en vectores de expresión	62
3.16.1	Clonación del gen EhCHS1 en el vector pJC45	62
3.16.2	Clonación de los genes EhCHS en el vector pHIS7	64
3.17	Expresión de las proteínas recombinantes en sistemas bacterianos	65
3.17.1	Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes EhChS1 y EhChS2	65
3.17.2	Obtención de extractos celulares a partir de bacterias transformadas	65
3.17.3	Análisis de las proteínas recombinantes en geles SDS-PAGE	66
3.18	Transfección de <i>E. histolytica</i> con los genes EhCHS	67
3.18.1	Amplificación de los genes EhCHS por PCR	67
3.18.2	Ligación de los genes EhCHS en los vectores de transfección	67
3.18.2.1	Desfosforilación del DNA plasmídico	68
3.18.2.2	Ligación del DNA de los genes EhCHS a los vectores plasmídicos	68
3.18.3	Transfección de <i>E. histolytica</i> por medio de electroporación	69
3.18.4	Selección de las amibas transfectadas	69
3.18.5	Inducción de la expresión en las amibas transfectadas con HygtetR O Cass/EhCHS	70

3.19	Análisis de la expresión de las proteínas EhCHS en amibas transfectadas	70
3.19.1	Preparación de extractos de proteínas de <i>E. histolytica</i>	70
3.19.2	Separación de proteínas de <i>E. histolytica</i> en SDS PAGE	72
3.19.3	Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa	72
3.20	Generación de anticuerpos anti-EhCHS de <i>E. histolytica</i>	73
3.21	Detección inmunológica de las proteínas	73
3.22	Tinción de las proteínas con plata	75

4 RESULTADOS

4.1	Análisis de secuencias de quitina sintasas reportadas en bancos de datos. Identificación de secuencias consenso	76
4.2	Ensayos de PCR con el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	77
4.3	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. histolytica</i> y secuenciación del gen EhCHS1	81
4.3.1	Tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> en λ ZAP usando como sonda el fragmento de 200 pb	82
4.4	Posición del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	84
4.5	Ensayos tipo Southern blot	85
4.6	Inducción al enquistamiento, ensayos tipo Northern blot	87
4.7	Ensayos de transcripción reversa	88
4.8	Expresión de la proteína EhCHS1 en un sistema bacteriano	89
4.9	Tamizaje virtual en TIGR-Bank para buscar otro posible gen EhCHS	91
4.10	Posición del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	94
4.11	Análisis del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	95
4.11.1	Análisis tipo Southern blot	95
4.11.2	Análisis tipo Northern blot	96
4.11.3	Expresión en sistemas bacterianos	96
4.12	Análisis de la estructura de los genes EhCHS1 y EhCHS2. Ensayos tipo RACE	96
4.13	Transfección de <i>E. histolytica</i> con los genes EhCHS1 y EhCHS2	98
4.13.1	Análisis tipo Northern blot de amibas trasfectadas	98
4.13.2	Análisis tipo Western blot	101

4.13.3	Detección inmunológica de las proteínas	101
4.14	Análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2	102
4.14.1	Comparación de EhChS1 y EhChS2 con la secuencia de otras quitina sintasas	106
4.14.2	Identificación de dominios transmembranales	107
4.14.3	Identificación de dominios conservados en las secuencias EhChS1 y EhChS2	110
4.15	Resultados con <i>E. invadens</i>	111
4.15.1	Amplificación por PCR con el DNA genómico de <i>E. invadens</i>	112
4.15.2	Análisis tipo Southern blot con el DNA de <i>E. invadens</i> usando como sonda el gen EhCHS1	112
4.15.3	Tamizaje de la biblioteca de DNA de <i>E. invadens</i> construida en el bacteriófago λ EMBL4	113
4.15.4	Análisis tipo Northern blot sobre el DNA de <i>E. invadens</i> usando como sonda el gen EhCHS1	114

5 DISCUSIÓN

5.1	Discusión	115 [®]
	Identificación de quitina sintasas	116
	Presencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el genoma de <i>E. histolytica</i>	117
	Análisis comparativo y estructural de las proteínas	119
	Análisis de las proteínas recombinantes	123
	Análisis tipo Northern blot en trofozoitos inducidos al enquistamiento	125
	Importancia y función de los cationes en el enquistamiento de <i>E. histolytica</i>	129
	El sistema de síntesis de glucógeno como un modelo para entender el proceso desíntesis de quitina y enzimas implicadas	130

5.2	Conclusiones	133
5.3	Perspectivas	134
5.4	Contribuciones del presente trabajo	136
BIBLIOGRAFÍA		137
CURRICULUM VITAE: Eduardo Campos Góngora		

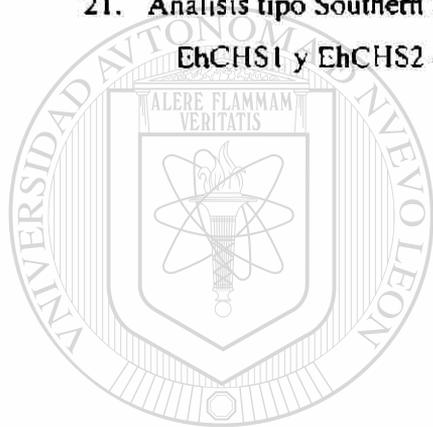
LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición de la reacción típica de PCR con el DNA genómico de Entamoeba	39
2.	Composición de la reacción de ligación en el vector PCR ^R 2.1	41
3.	Composición de una reacción típica de digestión con la enzima <i>Eco</i> RI sobre el DNA plasmídico	43
4.	Reacción de digestión del DNA para ensayos tipo Southern blot	53
5.	Composición de la reacción de digestión para eliminar al DNA como posible contaminante del RNA	59 [®]
6.	Composición de una reacción típica de RT sobre RNA total de Entamoeba	60
7.	Composición de una reacción típica de ligación en los vectores de expresión	63
8.	Regiones conservadas identificadas en la secuencia de aminoácidos de las quitina sintasas reportadas en los bancos de datos	76
9.	Secuencia de los oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las secuencias conservadas de los genes CHS	77
10.	Comparación de secuencias entre quitina sintasa de <i>E. histolytica</i> y quitina sintasas de otros organismos	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos degenerados P1-P6 y P5-P8 sobre el DNA genómico de <i>E. histolytica</i>	78
2. Representación esquemática de los resultados y estrategia seguidos en la primera etapa del trabajo	79
3. Estrategia de tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de <i>E. histolytica</i> construida en el vector λ ZAP	83
4. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS1) en el fragmento de 8 Kb secuenciado correspondiente a las clonas 5.2 y 1.1 del bacteriófago λ ZAP	84
5. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i> y de la región ocupada por éste	86
6. Análisis tipo Northern blot del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	88
7. Análisis de RT-PCR sobre el RNA total de <i>E. histolytica</i>	89
8. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes en el sistema bacteriano	90
9. Representación esquemática de la estrategia seguida para el tamizaje virtual del banco de datos TIGR-BANK usando como sonda la secuencia determinada en este trabajo correspondiente al gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	92
10. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS2) en el fragmento de DNA de <i>E. histolytica</i> secuenciado	94
11. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	95
12. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS1	97
13. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS2	98
14. Análisis tipo Northern blot de <i>E. histolytica</i> transfectada con el vector Neo Cass que acarrea los genes EhCHS1 o EhCHS2	99
15. Análisis tipo Northern blot de <i>E. histolytica</i> transfectada con el vector HygtetR O Cass modificado con los genes EhCHS1 y EhCHS2	100

16. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS1 de <i>E. histolytica</i>	103
17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	105
18. Perfil de hidrofobicidad de las presuntas quitina sintasas de <i>E. histolytica</i> codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2	108
19. Diagrama que representa los supuestos dominios estructurales de las ChS de <i>E. histolytica</i> y proteínas relacionadas	109
20. Análisis de secuencias consenso entre las proteínas ChS de <i>E. histolytica</i> y de especies relacionadas	111
21. Análisis tipo Southern blot de <i>E. invadens</i> usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2 de <i>E. histolytica</i>	113



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

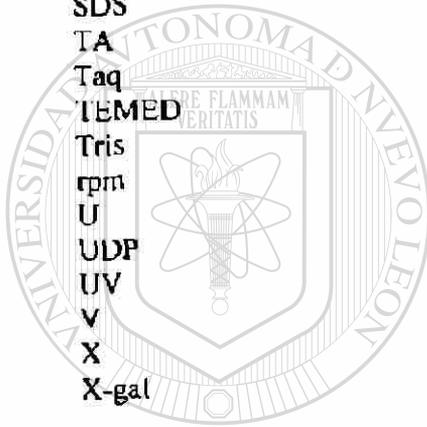


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AGT	Aglutinina de germen de trigo
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
AS	<i>Antisense</i> (Oligonucleótido en dirección 3' a 5')
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Seroalbúmina de bovino
cDNA	DNA complementario
CHS	Quitina sintasa (gen)
ChS 3	Quitina sintasa 3 (proteína codificada por el gen CHS3)
Chsp	Quitina sintasa (unidad protéica parte del complejo)
ChS III	Quitina sintasa III (complejo)
cm	Centímetros
°C	Grados Celsius
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxi-nucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
E-64	L-trans-Epoxysuccinil-L-leucilamido-(4-(guanidino)-buta
Ed	<i>Entamoeba dispar</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
Ei	<i>Entamoeba invadens</i>
<i>et al.</i>	" <i>et alteri</i> " (y otros)
EtOH	Alcohol etílico
g	Gramos
gal	Galactosa
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
G418	Sulfato de gentamicina G418
h	Horas
HEPES	N-(2-Hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico)
hyg	Fosfotransferasa de higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
kJ	Kilojoules
l	Litro
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
MOPS	Ácido propansulfónico 3-N-Morpholino

ms	Milisegundos
μ F	Microfaraday
μ g	Microgramos
μ l	Microlitro
μ M	Concentración micromolar
neo	Fosfotransferasa de neomicina
OD	Densidad óptica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
S	Sense (Oligonucleótido en dirección 5' a 3')
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilendiamino
Tris	Tris-hidroximetil aminoetano
rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidades enzimáticas
UDP	Difosfato de uridina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Fecha de Graduación: Octubre, 2002

Eduardo Campos Góngora
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del estudio: **QUITINA SINTASAS DE *Entamoeba histolytica*:
CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LA
ESTRUCTURA PRIMARIA**

Núm. de páginas: 147 Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Microbiología.
Área de estudio: Biología Celular y Molecular de protozoarios patógenos.

Propósito y método del estudio:

Entamoeba histolytica, el agente causal de la amibiasis humana, es responsable de millones de casos de colitis y absceso hepático cada año; presenta 2 etapas en su ciclo de vida, el trofozoíto y el quiste. La transmisión del parásito está restringida a la etapa de quiste ya que esta forma puede sobrevivir fuera del cuerpo humano y es resistente al medio ambiente ácido del estómago. Poco se sabe acerca de los requerimientos para la formación de quistes de *E. histolytica* debido principalmente a la carencia de un protocolo que permita la inducción del enquistamiento *in vitro*. La resistencia de los quistes a choques hipotónicos y otros factores adversos es debida a su pared, la cual contiene quitina, un polímero lineal de GlcNAc con enlaces β -(1 \rightarrow 4). La síntesis de quitina es catalizada por las enzimas denominadas quitina sintasas (UDP-GlcNAc:chitin 4- β -N-acetylglucosaminyltransferase, EC 2.4.1.16). En hongos, insectos y en *E. invadens*, la actividad de las quitina sintasas depende de la presencia de iones de Mg, Mn o Co. Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en medio suplementado con Mg²⁺, Mn²⁺ y Co²⁺, son capaces de diferenciarse y formar estructuras parecidas a quistes resistentes a SDS, y que además tienen una mayor proporción de GlcNAc en su pared sugiriendo que una quitina sintasa dependiente de iones está involucrada en la formación de quistes de *E. histolytica*. En este trabajo, por medio de PCR y *primers* degenerados se logró amplificar 2 fragmentos de los genes CHS de *E. histolytica* los que se usaron como sonda para tamizar una biblioteca de DNA de

E. histolytica. Se clonaron y secuenciaron 2 genes de *E. histolytica* (EhCHS1 y EhCHS2) que codifican para quitina sintasas. La expresión de los mRNA de las quitina sintasas no aumenta cuando los trofozoítos son inducidos a la diferenciación (por efecto de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}), lo cual sugiere que los genes que codifican para las quitina sintasas se expresan de manera constitutiva en cada una de las etapas y que posiblemente las quitina sintasas de *E. histolytica* se encuentran en forma de zimógeno.

El análisis de la estructura primaria de EhCHS1 y EhCHS2 deducido a partir de la secuencia de los respectivos genes reveló que: a) estas proteínas tienen un peso molecular de 73 y 114 kDa, respectivamente; b) la identidad entre estas proteínas, al nivel de aminoácidos, es solo del 23%, sin embargo, ambas proteínas presentan hasta 35% de identidad con respecto a quitina sintasas de otros organismos; c) La similitud está restringida principalmente al área central (400 Aa) conocida como la "región catalítica"; d) la secuencia de Aa que forman el sitio activo de las quitina sintasas de levaduras está completamente conservada en *E. histolytica*; e) las dos quitina sintasas contienen segmentos transmembranales en sus extremos N-terminal y C-terminal, sugiriendo que éstas son proteínas integrales de membrana como ha sido descrito para algunas de las quitina sintasas de levaduras.

Contribuciones y conclusiones:

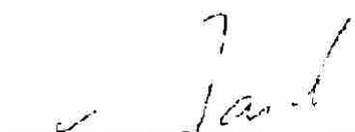
El conocimiento de los genes que codifican para las enzimas responsables de la síntesis de quitina en *E. histolytica* es un paso firme en el difícil camino hacia el conocimiento del proceso de síntesis de quitina en este protozooario parásito, y por consiguiente, al conocimiento de procesos involucrados en la diferenciación del organismo, específicamente en los aspectos concernientes a la síntesis de pared, organelo por demás importante en el ciclo de vida del parásito que lo capacita a ser una forma infectiva y responsable de la transmisión de la enfermedad.

En nuestro conocimiento, esta es la primera clonación de genes que codifican para quitina sintasas de un protozooario parásito.

Monterrey, N. L., México. Octubre del 2002



M. C. Eduardo Campos Góngora.



Dr. Salvador Said Fernández.

ABSTRACT

Graduation Date: October, 2002

Eduardo Campos Góngora
Autonomous University of Nuevo León
Biological Sciences School

Title: *Entamoeba histolytica* CHITIN SYNTHASES: CLONING
AND ANALYSIS OF PRIMARY STRUCTURE.

Page num.: 147 **Candidate to Doctor in Sciences**
with specialty in Microbiology.

Study area: **Molecular and Cell Biology of pathogenic protozoa.**

Goal and method of this study:

The fecal-oral spread intestinal protozoon parasite *Entamoeba histolytica*, the causative agent of human amoebiasis, is responsible for 50 millions of cases of colitis or liver abscess each year. The *E. histolytica* life-cycle consists of two stages, trophozoite and cyst. Transmission of the parasite is restricted to the cyst stage due to only this form can survive outside the human body and is resistant to the acid environment of the stomach. At present, very little is known about the requirements for *E. histolytica* cyst formation due to the lack of suitable protocols to induce cysts *in vitro*.

The characteristic resistance of cysts to hypotonic shock and other adverse factors is due to their wall. The wall of *E. histolytica* cysts contains chitin, a linear polymer of β -(1 \rightarrow 4) linked GlcNAc. The synthesis of chitin is catalyzed by chitin synthases (UDP-GlcNAc:chitin 4- β -N-acetylglucosaminyltransferase, EC 2.4.1.16). In fungi insects and *E. invadens* has been showed that chitin synthase activity is dependent on the presence of Mg, Mn or Co ions. *E. histolytica* trophozoites cultivated in a medium supplemented with Mg²⁺, Mn²⁺ and Co²⁺ are capable to form cysts-like structures resistant to SDS effect. In addition, they contain high quantities of GlcNAc, suggesting that an ion-dependent chitin synthase is involved in *E. histolytica* cyst formation.

In this work, two fragments of putative *E. histolytica* chitin synthase genes were amplified by PCR, by using degenerated primers. These fragments were used as probes for screening

an *E. histolytica*-DNA-library. Two *E. histolytica*-genes (EhCHS1 and EhCHS2) encoding putative chitin synthases were cloned and sequenced. The mRNA-EhCHS expression did not increase when the trophozoites were induced to differentiate with Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} in the culture medium. The above is suggestive that the chitin synthases are expressed constitutively on each *E. histolytica* differentiation stage, probably as zymogens.

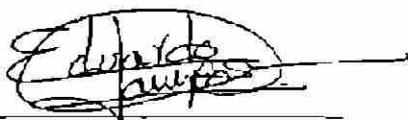
The protein primary structure, which were deduced from the EhCHS1 and EhCHS2 sequences, showed the following facts: a) The *E. histolytica* chitin synthases have a molecular weight of 73 and 114 kDa, respectively; b) the proteins showed only 23% amino acid identity each other, however, both proteins showed 35% identity with respect to chitin synthases from other organisms; c) similarity was mainly restricted to a central stretch of about 400 amino acid residues known as the "catalytic region"; d) The Aa sequence that form the active site of yeast chitin synthases is completely conserved in *E. histolytica*; e) both *E. histolytica* chitin synthases contain trans-membrane domains within their N-terminal and C-terminal parts, suggesting that these are integral membrane protein as some yeast chitin synthases.

Contributions and conclusions:

The knowledge of genes that codify for *E. histolytica* chitin synthase enzymes is a first step to understand the chitin synthesis mechanism in this parasitic protozoa, and the processes involved in the differentiation of this organism. specially the wall synthesis.

In our knowledge, this is the first time that the genes that codify for parasitic protozoa chitin synthases have been cloned.

Monterrey, N. L., México. October/2002



M. C. Eduardo Campos Góngora.



Dr. Salvador Said Fernández.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Amibiasis

La amibiasis es una enfermedad causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. Esta enfermedad se caracteriza por la producción de lesiones, principalmente en el hígado y el colon de las personas infectadas. Se considera que *E. histolytica* infecta cerca del 10% de la población mundial y que anualmente la amibiasis es causa de 50 millones de casos de colitis o absceso amibiano extraintestinal, dando como resultado la muerte de casi 50,000 personas (Petri *et al.*, 2000).

La colonización del intestino grueso sin invasión de las capas subyacentes es asintomática, pero cuando los trofozoitos invaden y lesionan la mucosa del colon se puede desarrollar colitis y disentería amibianas. La diseminación de los trofozoitos a través del torrente sanguíneo o linfático permite la invasión y lesión de prácticamente cualquier otro órgano o tejido, siendo el hígado el más frecuentemente afectado, resultando en el desarrollo de abscesos en estos tejidos (Ramakrishan y Petri, 2000).

1.2 Ciclo de vida de *E. histolytica*

El ciclo de vida de *E. histolytica* consiste de cuatro etapas consecutivas denominadas trofozoíto (forma vegetativa), prequiste, quiste (forma infectiva) y amiba metaquística (Martínez-Palomo, 1986). Los trofozoitos son las formas vegetativas del parásito y los responsables de las lesiones producidas en los órganos de los enfermos con amibiasis. Los quistes son las formas infectivas y responsables de la transmisión de la enfermedad.

En condiciones adecuadas los trofozoitos se diferencian, convirtiéndose en prequistes, luego en quistes mononucleados, y después de dos divisiones nucleares sucesivas, en quistes maduros tetranucleados. Los quistes salen del intestino con las heces y llegan al intestino del nuevo hospedero cuando son ingeridos junto con alimentos o agua contaminados. En este sitio la pared quística es perforada por una amiba metaquística tetranucleada, la cual abandona la

pared quística y rápidamente se divide, produciendo ocho pequeñas amibas mononucleadas que rápidamente alcanzan su tamaño normal (Martínez-Palomo, 1982).

A diferencia de los trofozoítos, los quistes maduros de *E. histolytica* permanecen viables por períodos relativamente largos (hasta 14 días), en un amplio rango de condiciones medio-ambientales adversas. Por ejemplo, los quistes resisten el efecto de los jugos gástricos, enzimas pancreáticas y bilis, hipoosmolaridad y otras condiciones desfavorables (Lushbaugh y Miller, 1988).

En el intestino, los trofozoítos se diferencian generando quistes. Los quistes son los responsables de propagar la infección por diseminación fecal-oral y el desenquistamiento en el intestino de un nuevo hospedero libera nuevos trofozoítos que pueden establecer una nueva infección (Ramakrishan y Petri, 2000).

1.3 Desenquistamiento

La infección por amibas del género *Entamoeba* inicia con la ingestión de formas enquistadas del parásito por parte de hospederos vertebrados. Así, cada parásito es expuesto a las altas concentraciones de H^+ presentes en el estómago del hospedero; y en su paso por el intestino delgado se expone a la compleja mezcla de secreciones liberadas por el conducto biliar en el duodeno, las cuales incluyen bicarbonato, que sirve para elevar el pH, enzimas digestivas tales como proteasas y lipasas y sales biliares que ayudan en la dispersión de los lípidos de la dieta alimenticia (Eichinger, 2001).

Los estímulos que inducen el proceso de desenquistamiento en el género *Entamoeba* no están bien definidos. Los quistes encontrados en las heces fecales se desenquistan después de que las muestras son tratadas con ácidos, aunque este tratamiento está dirigido principalmente a remover los flagelados y las bacterias acompañantes para tener un mejor control de las condiciones de cultivo y no para incrementar la eficiencia de desenquistamiento (cf. ref. Eichinger, 2001). Los quistes de *E. invadens* generados *in vitro* no desenquistan con mayor eficiencia después de tal tratamiento, dando los mismos bajos niveles de desenquistamiento

no-sincronizado que los obtenidos lavando los quistes con agua y detergente y resuspendiéndolos en medio de crecimiento para trofozoítos. Se ha determinado que niveles mucho más altos y desenquistamiento más rápido son obtenidos con amibas crecidas y enquistadas en medio suplementado con butirato (Eichinger, 2001).

1.4 Enquistamiento

Desde hace varias décadas, ha habido un gran número de intentos para tratar de entender los procesos concernientes al enquistamiento del protozooario parásito de humanos *E. histolytica*. Sin embargo, debido a la carencia de un modelo de enquistamiento *in vitro* que permita la formación de quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la mayoría de estudios encaminados a entender los procesos de diferenciación del parásito han sido realizados usando como modelo a *E. invadens*, un protozooario patógeno de reptiles (López-Romero y Villagómez-Castro, 1993).

El proceso de enquistamiento de *E. invadens* está acompañado por la deposición de una pared quística que contiene quitina (Arroyo-Begovich *et al.*, 1980), la expresión de glicoproteínas asociadas con ácido siálico específicas de la etapa de enquistamiento (Avron *et al.*, 1987), incremento en los niveles de actividad de las quitina sintasas (Das y Gillin; 1991) y de quitinasa (Villagómez-Castro *et al.*, 1992), y disminución de los niveles de actina (Manning-Cela *et al.*, 1994). De la misma manera, los estudios de Bond y col. (1992) demuestran la expresión de al menos 72 proteínas específicas de la etapa de quiste.

Los avances más recientes en esta área de investigación han permitido establecer un modelo hipotético que permite explicar el fenómeno de diferenciación del género *Entamoeba* (para una revisión ver Eichinger, 1997 y 2001).

Dentro del hospedero, el protozooario *E. histolytica* reside dentro de la capa mucosa del colon; la predilección de las amibas por este sitio se debe en parte a la presencia de un gran número de bacterias, y a la expresión en la superficie del trofozoíto de la lectina de unión galactosa/N-acetilgalactosamina (gal/galNAc) que tiene la más alta afinidad por macro-

complejos de ligandos de azúcar presentados por las moléculas de mucina que se encuentran en el colon y que son las principales glicoproteínas de la capa de mucosa (Eichinger, 2001). La lectina gal/galNAc de *E. histolytica* está compuesta de una subunidad mayor (170 kDa), la cual tiene un dominio transmembranal cercano a su extremo C-terminal (Mann *et al.*, 1991) y una subunidad menor (35 kDa), la cual tiene un anclaje glicosil-fosfatidil-inositol en su extremo C-terminal (Tannich *et al.*, 1991).

En la superficie de *E. invadens* se expresa una lectina similar cuya especificidad está limitada a galactosa (Eichinger, 2001-b).

In vitro, el enquistamiento del parásito *E. invadens* ocurre como una respuesta a condiciones hiposmóticas (Bailey y Rengpien, 1980; Avron *et al.*, 1986), a la eliminación de la fuente de carbono en el medio (Vázquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984) o a una combinación de ambos estímulos (Sánchez *et al.*, 1994). El nivel más alto de enquistamiento requiere la presencia de 5% de suero de bovino en el medio de inducción (Rengpien y Bailey, 1975). Cuando el suero de bovino es reemplazado con ligandos terminados en galactosa (asialofetúina, gal-BSA, o mucina), se observa un efecto dependiente de la concentración de estas moléculas, lo cual sugiere que una proporción específica de ligando y lectina conlleva a una señal requerida para iniciar el proceso de enquistamiento (Coppi y Eichinger, 1999).

Las especies patógenas pertenecientes al género *Entamoeba* expresan enzimas que sirven para eliminar localmente la capa de mucosa en los sitios de multiplicación de las amibas. La capa de mucosa se rompe permitiendo la difusión de bacterias que son tragadas por las amibas en el sitio de la multiplicación. El hecho de que bajas concentraciones de mucina sean capaces de disparar la diferenciación indica que la lectina gal de *E. invadens*, y probablemente la lectina gal/galNAc de *E. histolytica*, están involucradas no solamente en la retención física de las amibas dentro de la capa del colon, sino también en el monitoreo de la integridad de dicha capa. (Eichinger, 2001-b). En un modelo acorde a estos resultados, las amibas podrían estar expuestas a una cantidad reducida de mucina cuando su número se incrementa, y en algún punto, la concentración local de mucina podría atrapar moléculas de lectina en la superficie del parásito iniciando así el proceso de diferenciación (Eichinger, 2001).

1.5 Estructura del quiste

El ciclo de vida de *E. histolytica* en el hospedero humano no ha sido confirmado. El único estudio detallado en esta área de investigación fue realizado por Dobell en 1928 en cultivos de una cepa amibiana obtenida de un mono. Desde entonces, prácticamente no ha habido avances en la descripción original por lo que habrá que referirse al trabajo de este investigador para conocer los detalles de las supuestas 4 etapas en el ciclo de vida de *E. histolytica*: el trofozoito, pre-quiste, quiste y amiba metaquistica (Martínez-Palomo, 1986).

Los quistes son redondos o de forma ligeramente ovalada, presentan un tamaño que va de 8 a 20 μm de diámetro. En preparaciones sin teñir, aparecen como cuerpos hialinos con una pared refractil y un citoplasma incoloro. Los quistes maduros presentan 4 núcleos que son más pequeños que los de los trofozoitos. Los quistes inmaduros frecuentemente presentan cuerpos cromatoides compuestos de ribosomas que se agregan para formar estructuras alargadas en forma de bastón con extremos redondeados; los cuerpos cromatoides desaparecen cuando el quiste madura. Cuando los quistes son teñidos con hematoxilina de hierro su citoplasma aparece vacuolado, con numerosos depósitos de glucógeno que disminuyen en tamaño y número a medida que el quiste madura.

La pared de los quistes mide 125 a 150 μm de grueso y parece estar compuesta de elementos fibrilares de 2 a 3 μm de diámetro que forman una fuerte malla, la cual posiblemente da lugar a varias lamelas. Se ha demostrado que el polisacárido principal de la pared de quistes de *E. invadens* es quitina. Recientemente los genes que codifican para quitinasas de *E. invadens*, *E. coli* y *E. histolytica* han sido clonados pero su expresión ha sido detectada únicamente en el enquistamiento de *E. invadens* (cf. ref. Martínez-Palomo, 1986; Clark *et al.*, 2000).

La pared constituye uno de los organelos más importantes de los quistes porque les confiere su resistencia y forma característica. Los elementos moleculares de las paredes quísticas son completamente diferentes a los que se encuentran en la membrana plasmática de los trofozoitos y por lo tanto su aparición en la superficie de las amibas es fácilmente identificable e indicativo de un proceso de diferenciación.

1.6 Síntesis de pared en *Entamoeba*

Durante el proceso de enquistamiento, uno de los eventos más relevantes es la síntesis o estructuración de una pared que confiere resistencia al quiste recién formado.

La función biológica de la pared quística es la de proteger a la célula en criptobiosis de condiciones de hiposmolaridad y otros factores desfavorables, como el efecto de sustancias tóxicas (Neff y Benton, 1962; Arroyo-Begovich *et al.*, 1980).

En la composición de las paredes de *E. invadens*, *E. histolytica* y *E. coli* juega un papel destacado la quitina. En 1980, basados en estudios de difracción de rayos X, Arroyo-Begovich y col. demostraron que el componente mayoritario de la pared de quistes de *E. invadens* es quitina (Arroyo-Begovich *et al.*, 1980).

En ese mismo año, Arroyo-Begovich y Carabéz-Trejo (1980) observaron que las paredes de quistes de *E. invadens* tienen una fuerte afinidad por aglutinina de germen de trigo, lectina que reconoce específicamente secuencias de N-acetilglucosamina con enlaces β (1 \rightarrow 4). En el mismo trabajo, los autores mencionan que las paredes de quistes naturales de *E. histolytica* y *E. coli* también muestran afinidad por la aglutinina de germen de trigo pero notablemente menor que las paredes de los quistes de *E. invadens*, lo cual sugiere que estas estructuras también poseen secuencias de GlcNAc, aunque aparentemente de menor longitud y en menor cantidad que las paredes de *E. invadens*. De tal manera, la síntesis del polisacárido quitina parece ser un evento clave en la formación de la pared de quistes del género *Entamoeba*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.7 Quitina

La quitina es un polímero lineal formado por pares de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β 1 \rightarrow 4 (N, N' diacetilquitobiosa). Es el segundo polímero biológico más abundante, después de la celulosa. La quitina es frecuentemente referida como un homopolímero de N-acetil- β -D-glucosamina, lo cual podría no ser completamente cierto dado que la glucosamina es también encontrada en cierto grado en la quitina (Neville, 1975). Así también, aunque los nombres "quitina" así como el producto derivado de la desaminación de ésta, "quitosan", son ampliamente usados, ninguno de esos términos corresponde una estructura química única. Es generalmente conocido que la quitina no existe normalmente en la naturaleza como una

sustancia única, sino que se presenta formando complejos con otras sustancias. En el exoesqueleto de insectos y crustáceos la quitina se encuentra formando complejos con proteínas o puede estar endurecida por entrecruzamientos con poli-hidroxifenoles (esclerotizada), mientras la quitina en los hongos (quitina fúngica) forma complejos con otros polisacáridos incluyendo a la celulosa (Ruíz-Herrera, 1977).

Hasta ahora, la quitina pura solamente ha sido identificada en las espinas extracelulares de las diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* y *Cyclotella cryptica*. Así, poli-[β -(1 \rightarrow 4)-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranosas] como una entidad es, de manera normal, solamente obtenida en el laboratorio después de un riguroso proceso de purificación para remover los otros componentes. Detalles acerca de los aspectos físicos y químicos de la quitina y su interacción con proteínas han sido publicados en varias revisiones (cf. ref. Spindler, *et al.*, 1990).

Las microfibras de quitina pueden estar organizadas en paralelo formando la llamada β -quitina, algunas veces también se presentan en una forma mezclada (de cada 3 cadenas de polímero, dos son paralelas: γ -quitina) y la manera más frecuente de encontrar a la quitina es en forma de α -quitina, donde las cadenas de polisacáridos están orientadas de forma antiparalela (Spindler, *et al.*, 1990).

La gran fuerza y estabilidad del polímero le permiten jugar un papel muy importante como esqueleto estructural sobre el que descansan otros componentes que forman parte de estructuras de protección de diversas especies animales (Cohen, 1987). Además, la quitina es un componente principal de la matriz peritrófica del intestino de insectos, formando una barrera entre el medio ambiente externo y los tejidos internos de estos organismos (Kramer y Koga, 1986).

La presencia de quitina ha sido demostrada en hongos, algunas algas y varios *phyla* de invertebrados. Tanto protozoarios como metazoarios pueden contener quitina como un componente estructural. Entre los metazoarios, sintetizan quitina todos los protostómidos, excepto platelmintos y nemertínidos. Entre los deuterostomados, solamente lo hacen tunicata y pognófora (los cuales poseen microfibras que contienen quitina y proteínas). Otros deuterostomados, incluyendo todos los vertebrados, carecen de quitina (para una revisión ver: Muzzarelli, 1977; Jeniaux, 1982). Además, la quitina se ha detectado en algunos protozoarios,

como *Giardia lamblia* y *Entamoeba invadens*, acantocéfalos, nemátodos (*Ascaris suum*, *Brugia malayi*), pentastómidos y moluscos, y en todos los artrópodos (crustáceos, arácnidos y moluscos) (cf. ref. Spindler *et al.*, 1990).

Varias especies de hongos, incluyendo levaduras, han sido las más estudiadas en aspectos de síntesis de quitina. En las paredes de éstos se ha encontrado un contenido de quitina que varía según la especie. En *Saccharomyces cerevisiae* el 3% de la masa de la pared celular es quitina (Klis, 1994), mientras que en el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* (patógeno de plantas), este polisacárido representa entre el 14 y el 16% del peso seco de las paredes de levaduras y células miceliales, respectivamente (Ruíz-Herrera *et al.*, 1996)

Las fibras de quitina tienen una fuerte afinidad por la aglutinina de germen de trigo. Los complejos quitina-aglutinina de germen de trigo-fluoresceína fluorescen intensamente bajo luz ultravioleta. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la masa de quitina contenida en la pared de los quistes o la longitud de las fibras de quitina que componen la matriz de estas estructuras. Los quistes de *E. invadens* incubados en presencia de aglutinina de germen de trigo marcado con fluoresceína fluorescen con mucha mayor intensidad que los de *E. histolytica* o *E. coli* (Arroyo-Begovich y Carabéz-Trejo, 1980). Estos resultados son sugerentes de que el contenido de quitina, o la longitud de las cadenas de este polímero en las paredes de los quistes de *E. histolytica* y *E. coli*, es notablemente menor que en las paredes de *E. invadens*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En hongos la biosíntesis y deposición de quitina durante la síntesis de pared es un proceso muy complejo, no completamente entendido. Este proceso involucra la biotransformación secuencial de metabolitos simples, polimerización de intermediarios biosintéticos y transporte del producto al exterior de la membrana plasmática. Todo ello requiere de un número importante de enzimas y factores (cf. ref. Bartnicki-García, 1989; Cabib, 1987; Peberdy, 1990; Ruíz Herrera, 1992).

1.8 Síntesis de quitina

La biosíntesis de quitina es un proceso complejo que consiste de una serie de pasos enzimáticos. El proceso inicia con una unidad de glucosa, la cual es convertida a GlcNAc, unida con trifosfato de uridina (UTP), transportada dentro de la célula, polimerizada en quitina y unida covalentemente a proteínas para formar microfibras de quitina en la cutícula o en las paredes celulares (Palli y Retnakaran, 1999).

La síntesis de quitina a partir del precursor UDP-GlcNAc, es catalizada por quitina sintasas (UDP-GlcNAc:chitin 4- β -N-acetylglucosaminyl-transferase, EC 2.4.1.16). Se ha postulado que dos residuos de GlcNAc son adicionados en cada ciclo catalítico ya que esto acomoda los cambios en configuración anomérica del sustrato y producto sin que la enzima o producto polimerizado tengan que rotar 180° entre adiciones consecutivas del monómero (Saxena, *et al.*, 1995). Aún no está claro si se requiere un oligosacárido corto como iniciador de la reacción. Cada ciclo catalítico involucra la translocación del polímero de quitina en crecimiento de los sitios de unión de la quitina sintasa con el sustrato después de las dos adiciones de GlcNAc. El polímero de quitina permanece de esta manera unido a la enzima, preparado para el siguiente ciclo catalítico.

El ensamble de quitina ocurre sin la formación de quito-oligosacáridos libres (Horsch *et al.*, 1996). Así, en contraste con el punto de vista original, no hay necesidad de un aceptor soluble de GlcNAc, es decir, un quito-oligómero con $n \leq 10$ (análogos más grandes son insolubles). La quitina exógena tampoco actúa como un iniciador, y no hay evidencia de que un intermediario o un aceptor lipídicos estén involucrados. Sin embargo, hay reportes de la formación de glicolípidos unidos a GlcNAc (GlcNAc-glicosildiacilglicerol) que actúan como intermediarios de la síntesis de quitina y quito-oligómeros unidos a dolicolfosfato con una cadena de 8 residuos de longitud máxima. Este último parece ser transferido a un aceptor polipeptídico y actuar como un sustrato aceptor de GlcNAc para la enzima quitina sintasa. En cualquier caso, la evidencia experimental implica que la quitina sintasa actúa unida covalentemente a un sustrato iniciador (*primer*); el cual, de acuerdo a la definición de quitina sintasas como enzimas que catalizan la incorporación de unidades de UDP-GlcNAc desde un azúcar donador hasta un sustrato aceptor polipeptídico de GlcNAc, es quitina.

No se sabe si al supuesto complejo quitina sintasa-sustrato iniciador y al sitio de unión a UDP-GlcNAc implicados en los eventos de elongación de la cadena de quitina les corresponden distintas regiones del mismo polipéptido (polipéptido de quitina sintasa multienzimático) o están situados en dos diferentes polipéptidos estrechamente asociados (complejo multienzimático) (para una revisión ver: Merz *et al.*, 1999).

Hay adicionalmente un requerimiento de una enzima que catalice la remoción de la cadena del polímero, o parte de ella, para producir quitina pura. Por lo tanto, el modo de acción de la quitina sintasa no puede ser concebido de una manera adecuada sin tomar en cuenta la acción conjunta, debidamente balanceada, de actividad quitinolítica (Merz *et al.*, 1999).

Para que la quitina sintetizada cumpla con su función en los sistemas biológicos, deberá haber un mecanismo que transporte el polímero de quitina sintetizada *de novo* desde el interior de la célula (donde supuestamente se encuentra el dominio catalítico de la enzima) hacia el medio extracelular. Y finalmente deberá haber también un número de pasos post-síntesis en la superficie celular involucrando la formación de fibras de quitina semicristalinas, asociación de éstas con proteínas cuticulares y por último, la formación de una estructura macromolecular quitina/proteína con extensas modificaciones químicas. Por lo anterior, la formación de fibras de quitina es un proceso extremadamente complejo y pobremente entendido (Tellam *et al.*, 2000).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS **1.9 Quitina sintasas**

Glaser y Brown (1957) encontraron que una preparación enzimática del hongo *Neurospora crassa* cataliza la incorporación de monómeros de GlcNAc, usando como sustrato uridina 5'difosfato (UDP)-GlcNAc a un polímero indistinguible de la quitina auténtica.

La ecuación general para la reacción de síntesis de quitina es la siguiente:



La reacción depende de quitina sintasas. Estas son enzimas monoméricas (UDP-2 acetamido 2-deoxi-D-glucosaquitina 4-β-acetamidodeoxiglucosil transferasas) que requieren la presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) y GlcNAc como activadores.

Desde la primera descripción de la enzima responsable de la síntesis de quitina como una N-acetilglucosiltransferasa que usa el monómero activado difosfato de uridina-GlcNAc (UDP-GlcNAc) como el donador de GlcNAc, la quitina sintasa ha permanecido como una enzima intrigante y atractiva para bioquímicos, biólogos celulares y moleculares, entomólogos, micólogos, parasitólogos, científicos que representan otras disciplinas y también para investigadores en la educación y en la industria. Desafortunadamente, y a pesar del gran interés y la vasta bibliografía relacionada con las quitina sintasas obtenida a lo largo de 4 décadas de investigación, solo se han obtenido información modesta sobre las características bioquímicas básicas de la enzima (Merz *et al.*, 1999).

El conocimiento de las propiedades estructurales de la enzima es sorprendentemente pequeño y principalmente relacionado a la secuencia de aminoácidos (Aa) deducida a partir de genes de quitina sintasa (CHS) clonados. Algunos de los cuales, sin embargo, codifican para UDPGlcNAc-transferasas que no catalizan la reacción asignada por definición a las quitina sintasas.

De la misma forma, por medio de análisis de predicción, se ha logrado identificar las regiones que probablemente representan los dominios implicados en la función catalítica de estas enzimas. El alineamiento múltiple de las secuencias aminoácidas deducidas a partir de la secuencia de los genes permitió identificar una sección de aproximadamente 450 Aa que presenta una alta homología entre todos los genes conocidos hasta ahora. En esta región se determinó más tarde, por medio de análisis mutacional (Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998), la presencia de residuos esenciales para la actividad catalítica de la enzima. Posteriormente, estudios de predicción de estructura para quitina sintasas y proteínas relacionadas usando análisis de grupos hidrofóbicos (Miyazaki y Ootaki, 1997) y modelaje basado en el conocimiento de la homología (Horsch y Sowdhamini, 1996) concluyeron independientemente que el plegamiento de la proteína es del tipo β/α y dan una selección de Aa que son invariables en todos los genes CHS y otros genes que codifican para β-glucosiltransferasas. Un estudio usando el programa QSLAVE, un sistema experto para la

predicción de plegamiento de proteínas (Johnson *et al.*, 1993), permitió proponer un plegamiento de la proteína en forma de barril (α/β)₈ (para una revisión ver Merz *et al.*, 1999).

Además de los análisis de predicción, también se han realizado una gran cantidad de ensayos biológicos encaminados a determinar las condiciones de reacción de las quitina sintasas.

En algunos hongos la actividad de quitina sintasa está asociada a fracciones membranales de las paredes (Gooday, 1977). En otros casos se ha encontrado la mayor actividad específica de la quitina sintasa en la fracción microsomal (Farkas, 1979).

Las quitina sintasas han sido purificadas de diversas especies de levaduras y hongos filamentosos (Bartnicki-García *et al.*, 1978; Kang *et al.*, 1984; Leal-Morales, *et al.*, 1988; Selitrennikoff, 1979). En algunas especies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Ustilago maydis*, etc. se han encontrado varias isoenzimas de este tipo.

A la fecha, el modelo más estudiado para entender el proceso de síntesis de quitina y los genes y proteínas involucrados en dicho proceso es *S. cerevisiae* (para una revisión ver: Valdivieso *et al.*, 1999). En esta especie la quitina representa solamente el 3% de la masa de la pared celular, sin embargo, hay evidencias que indican que *S. cerevisiae* no puede sobrevivir sin quitina (Bowers *et al.*, 1974; Shaw *et al.*, 1991). *S. cerevisiae* contiene 3 diferentes quitina sintasas (ChS) responsables de la síntesis de este polímero: ChS I actúa como una enzima de reparación al tiempo de la citoquinesis (Cabib *et al.*, 1989, 1992) ChS II forma el disco de quitina del septo primario que separa las células madre e hija (Sburlati y Cabib, 1986; Shaw *et al.*, 1991) y ChS III que sintetiza el 90–95% de la quitina celular, incluyendo la quitina sintetizada durante la gemación y la esporulación (Roncero *et al.*, 1988; Valdivieso *et al.*, 1991; Pammer *et al.*, 1992). Cada ChS contiene al menos una subunidad catalítica codificada respectivamente por los productos de los genes CHS1, CHS2 y CHS3 (Bulawa, 1993; Cabib, *et al.*, 1996). El hecho de que cada ChS tiene una función celular diferente, sugiere que la actividad de cada enzima debe ser espacial y temporalmente regulada. Así, se ha propuesto que ChS I y ChS II son reguladas tanto en el nivel transcripcional (Pammer *et al.*, 1992) como en el nivel postraducciona (Choi *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1996), esto último realizado por medio de procesamiento proteolítico (revisado en Cabib, *et al.*, 1996).

Además de los genes CHS1, CHS2 y CHS3, los productos de otros 4 genes (CHS4, CHS5, CHS6 y CHS7) han mostrado ser requeridos para regular la actividad de síntesis de quitina (Bulawa, 1993). Chs4p cumple dos funciones: es un activador directo de la actividad del complejo ChS III (Trilla *et al.*, 1997) y al mismo tiempo es responsable del anclaje de la proteína Chs3p al anillo de septina durante la formación del septo (DeMarini *et al.*, 1997). La proteína Chs5p está involucrada tanto en el transporte de Chs3p en vesículas especializadas (Santos y Snyder, 1997), como en el transporte de otras proteínas durante la gemación (Santos *et al.*, 1997); y Chs7p que regula la actividad del complejo ChS III controlando el transporte de la unidad proteica Chs3p desde el retículo endoplásmico (Trilla *et al.*, 1999).

Los resultados de Trilla y col. (1999) demuestran que CHS7 es el único gen cuya transcripción se ve aumentada bajo todas las condiciones en las cuales la síntesis de quitina en *S. cerevisiae* es incrementada.

Así, queda ampliamente demostrado que la regulación transcripcional de CHS3, el gen que codifica para la subunidad catalítica de ChS III no es el mecanismo que controla la actividad de ChS III (Choi *et al.*, 1994; Chuang y Schekman, 1996; Coss *et al.*, 1998); y que dicha función depende principalmente del transporte y localización apropiados de Chs3p (Trilla *et al.*, 1999). función que cumplen las proteínas producto de los genes CHS4 y CHS7 de *S. cerevisiae*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.10 Clonación y caracterización de genes de quitina sintasas. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los genes de diversos hongos filamentosos y levaduras que codifican para esta clase de enzimas han sido clonados y su secuencia determinada. Entre ellos, los genes que codifican para las quitina sintasas I, II y III de *S. cerevisiae* y los de *C. albicans* (cf. ref. Ruíz-Herrera and Xoconostle-Cázares 1995). El porcentaje de similitud entre las secuencias de Aa de estas enzimas es considerablemente alto y esto ha permitido clonar genes de quitina sintasa de diversas especies de hongos, como las de *Aspergillus fumigatus*, utilizando hibridación heteróloga de secuencias derivadas de las de *S. cerevisiae* (Mellado *et al.*, 1995).

De la misma manera, recientemente se ha reportado la clonación de genes CHS en insectos (*Lucilia cuprina*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*) y gusanos (*Caenorhabditis*

elegans, *Brugia malayi*), aunque los estudios sobre las quitina sintasas en estas especies son escasos comparados a los realizados en quitina sintasas de hongos y levaduras.

Tellam y col. (2000) presentan los resultados de la determinación y análisis de la secuencia de Aa deducida del cDNA de la quitina sintasa de *Lucilia cuprina* y hacen un estudio comparativo entre las quitina sintasas de artrópodos y levaduras demostrando que la homología mas alta encontrada entre dichas secuencias corresponde a la región catalítica.

Por medio de análisis mutacional en CHS1 y CHS2 de *S. cerevisiae* se ha demostrado que dicha región catalítica es esencial para la actividad de la enzima (Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998), determinando además cuales son los dominios y Aa esenciales para que estas proteínas puedan realizar su función. Además, se ha encontrado que una mutación del Aa arginina que forma parte del dominio QRRRW (secuencia señal característica de todos los genes CHS) resulta en la pérdida tanto de la función *in vivo* como de la actividad enzimática de ChS3 (Cos *et al.*, 1998).

El análisis de la secuencia de Aa deducida a partir de la secuencia de los genes de quitina sintasa demuestra que estas proteínas son relativamente grandes y contienen múltiples dominios transmembranales reflejando así su asociación ya sea con la membrana plasmática o con vesículas intracelulares (quitosomas). Las secuencias de Aa deducidas son de longitud variable en un rango entre 650 y 1635 Aa, lo cual es debido principalmente a diferencias en los extremos N-terminal y C-terminal de las proteínas. A pesar de la considerable variación en longitud, las quitina sintasas muestran una significativa, aunque baja, homología en la secuencia de Aa; homología localizada principalmente en el dominio catalítico central el cual está rodeado por múltiples segmentos transmembranales (Cid *et al.*, 1995)

1.11 Quitina sintasa y síntesis de quitina en *E. invadens* y *E. histolytica*.

En *E. histolytica*, el principal obstáculo para estudiar adecuadamente los quistes y el proceso de enquistamiento consiste en la falta de un medio y un método que permitan la producción de quistes de esta especie en condiciones axénicas (López-Romero y Villagómez-Castro, 1993; Eichinger, 1997). Ante la dificultad de obtener quistes de *E. histolytica* en cultivos axénicos, la

mayoría de los investigadores interesados han enfocado sus esfuerzos a estudiar el proceso de enquistamiento de *E. invadens*, un protozooario parásito de reptiles, con el fin de obtener evidencias que permitan dilucidar los mecanismos implicados en dicho proceso. Sin embargo, los datos obtenidos al respecto no son claramente extrapolables a *E. histolytica*.

Das y Gillin (1991) demostraron la presencia de dos formas de quitina sintasa en *E. invadens*: una forma soluble y una forma particulada, y sugirieron que esta enzima podría ser esencial para la formación de la pared quística de la especie mencionada. El 60% de la actividad enzimática de la quitina sintasa de *E. invadens* está en el sobrenadante de alta velocidad (quitina sintasa soluble) y presenta su mayor actividad a pH 6.0. El 40 % restante se encuentra en forma particulada y tiene actividad a pH entre 7.0 y 7.5. La actividad de ambas fracciones depende de la presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} .

Ninguna de las formas de la quitina sintasa, particulada o soluble, de *E. invadens* se activa con tripsina, lo cual indica que esta enzima no se encuentra en forma de zimógeno en estos parásitos. La actividad enzimática de la quitina sintasa es inhibida por UDP, UDP-glucosa y UDP-GalNAc, pero no por polioxina D o nikkomicina Z (inhibidores específicos de la actividad de quitina sintasas de hongos).

Said-Fernández y col. describieron el medio PEIIPS (Said-Fernández *et al.*, 1988) en donde los quistes de *E. histolytica* se forman espontáneamente en cultivos envejecidos. Estos quistes tienen la propiedad de unir aglutinina de germen de trigo en proporciones mucho mayores que los trofozoitos (Said-Fernández *et al.*, 1993). Esta afinidad es mucho más intensa cuando los quistes han sido formados en presencia de $CoCl_2$, $MgCl_2$ y $MnCl_2$. Además, las células formadas en presencia de los cationes divalentes resisten el efecto de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% (Campos- Góngora, *et al.*, 2000); este detergente es capaz de destruir cualquier célula que no posea una pared sólidamente estructurada. Posteriormente, este mismo grupo de trabajo demostró que las paredes de los quistes de *E. histolytica* formados en medio PEHPS adicionado con Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} , presentan un mayor contenido de GlcNAc que los trofozoitos y que los quistes formados en medio PEHPS sin cationes adicionados (Said-Fernández *et al.*, 2001). Estas evidencias sugieren fuertemente que cuando *E. histolytica* se cultiva en medio PEHPS adicionado con cationes, se induce un proceso de diferenciación celular y las estructuras resultantes son capaces de sintetizar un polisacárido rico en GlcNAc,

presumiblemente quitina; lo cual implica la presencia de una o varias quitina sintasas. Sin embargo la presencia de dichas enzimas en esta especie no había sido demostrada experimentalmente.

1.12 Modelo actual de la síntesis de pared en *E. invadens*

Se puede considerar que los estudios sobre el enquistamiento de amibas han ocurrido en tres etapas históricas: desarrollo de medios de cultivo, estudio del papel que desempeña la flora bacteriana acompañante del parásito en el intestino y la aplicación de técnicas de biología molecular (Eichinger, 1997).

Actualmente, un modelo para la síntesis de la pared quística de *E. invadens*, que como se sabe contiene una mezcla de proteínas y quitina, está también desarrollándose. El grupo de trabajo del Dr. John Samuelson reportó la presencia de estructuras con funciones parecidas al aparato de Golgi en amibas enquistándose por medio del seguimiento de la producción y localización de quitinasa (Ghosh *et al.*, 2000), proteína que es sobre-expresada durante este proceso presumiblemente para ayudar en la remodelación de las fibras de quitina recién formadas. La localización de quitinasa a un compartimiento vesicular fue dependiente de la presencia de una secuencia-sígnal amino-terminal; mientras que la inclusión de una señal de retención para el retículo endoplásmico restringió a la quitinasa a un compartimiento vesicular distinto. ®

Este mismo grupo ha identificado una proteína principal (llamada Jacob) de la pared de quistes de *E. invadens*, y basándose en su secuencia de Aa y localización dentro de la pared de quistes, propone que dicha proteína está involucrada en dirigir la deposición de quitina durante la formación de pared. Jacob es la glicoproteína más abundante de la pared de quistes de *E. invadens*; contiene dominios ricos en cisteína similares a los dominios de unión a quitina de las proteínas de la matriz peritrófica de insectos. De hecho, la proteína amibiana se unió a quitina purificada y a paredes de quistes extraídas con detergentes. Los azúcares en la proteína Jacob se unieron espontáneamente a lectinas específicas de galactosa (Frisardi *et al.*, 2000). Esto sugiere un modelo de ensamble de la pared quística en el cual una lectina gal en la superficie de amibas enquistándose, se une a la proteína Jacob y ésta a su vez, por medio de los dominios de unión a quitina, se une a moléculas del polisacárido (sintetizadas por una

presunta quitina sintasa específica de la etapa de enquistamiento) cuando éstas son liberadas en la superficie de las amibas. Durante el desenquistamiento, la pared quística es degradada después de que la quitinasa se une a la quitina vía sus 8 dominios de unión a quitina.

Cuatro lectinas con dominios de unión a quitina, homólogas a las descritas en *E. invadens*, están también presentes en *E. histolytica* (Jacob, quitinasa, y Jessies 2 y 3). Estas proteínas fueron expresadas en vesículas secretorias de amibas transfectadas y se observó que se unen a quitina particulada (Van Dellen *et al.*, 2002).

1.13 Justificación

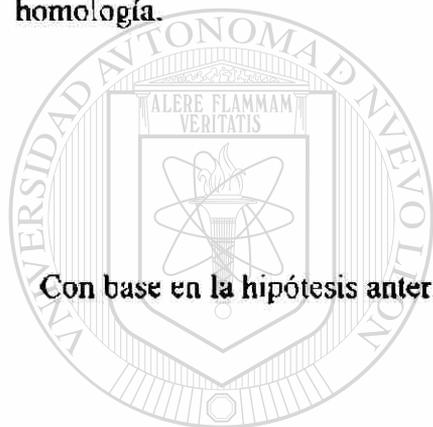
A la fecha se han realizado estudios moleculares sobre las quitina sintasas de varias especies de: a) hongos y levaduras como: *S. cerevisiae* (Bulawa *et al.*, 1986; Cabib *et al.*, 1989; Orlean P, 1987; Bulawa y Osmond, 1990; Sburlati y Cabib, 1986; Silverman *et al.*, 1988), *Mucor rouxii* (McMurrough y Bartnicki-García, 1971), *Botrytis cinerea* (Causier *et al.*, 1994), *N. crassa* (Glaser y Brown, 1957; Selitrennikoff, 1979; Yarden y Yanofsky, 1991; Beth-Din y Yarden, 1994; Beth-Din *et al.*, 1996), *A. fumigatus* (Mellado *et al.*, 1995), *U. maydis* (Gold y Kronstad, 1994; Ruiz-Herrera y Xoconostle-Cázares, 1995), etc. b) artrópodos como *Lucilia cuprina* (Tellam *et al.*, 2000), *Aedes aegypti*, (Ibrahim *et al.*, 2000) *Drosophila melanogaster* (Tellam *et al.*, 2000; Gagou *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2002) y c) gusanos: *Caenorhabditis elegans* (Veronico *et al.*, 2001) y *Brugia malayi* (Harris *et al.*, 2000). En estos organismos se han determinado ampliamente las características químicas y condiciones de síntesis de dichas proteínas, pero poco se sabe de las quitina sintasas de protozoarios patógenos.

Debido a que la quitina es muy abundante en artrópodos, insectos, hongos y protozoarios, pero está ausente en plantas y mamíferos (Muzzarelli *et al.*, 1986), las quitina sintasas son un blanco atractivo en el desarrollo de drogas antiparasitarias (Cohen, 1987; Gooday, 1990; Spindler *et al.*, 1990). La(s) quitina sintasa(s) de *E. histolytica*, por lo tanto, son moléculas muy dignas de estudiarse, porque un compuesto efectivo e inocuo capaz de inhibir la actividad de estas enzimas podría interrumpir el ciclo biológico del parásito. Un primer y firme paso en

este proceso será la clonación y secuenciación del gen(es) que codifique(n) para esta(s) enzima(s).

1.14 Hipótesis

Los quistes de *E. histolytica* contienen quitina y por lo tanto deben tener uno o más genes que codifican para quitina sintasas. Dado que existe una región con gran homología en genes de diferentes especies que codifican para estas enzimas, es posible clonar los genes de *E. histolytica* utilizando como sondas secuencias degeneradas de las regiones de alta homología.



1.15 Objetivos

Con base en la hipótesis anterior, los objetivos del presente trabajo fueron:

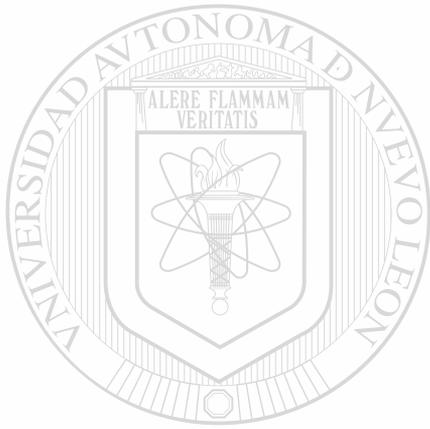
1.15.1 Objetivo general

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Clonar y secuenciar los genes (EhCHS) que codifican para las quitina sintasas de *E. histolytica*.
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.15.2 Objetivo específicos

- 1) Diseñar oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de un fragmento(s) correspondiente(s) al gen(es) EhCHS de *E. histolytica*.
- 2) Tamizar una biblioteca de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λ -ZAP para identificar y aislar la(s) clona(s) portadoras del DNA que codifica para la quitina sintasa de *E. histolytica*.

- 3) **Determinar la secuencia de nucleótidos de los genes EhCHS (que codifican para quitina sintasas) en *E. histolytica*.**
- 4) **Analizar la estructura primaria de la(s) proteína(s) deducidas a partir de la secuencia de DNA determinada.**
- 5) **Clonar el (los) gen(es) de la quitina sintasa en un vector de expresión para inducir la sobre-expresión de la proteína recombinante.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2 MATERIAL

2.1 Origen de los reactivos

2.1.1 Reactivos químicos

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes marcas comerciales:

Amersham Pharmacia Biotech; Braunschweig*	α -[³² P]-dATP 50 uCi
Appligene Oncor; Heidelberg*	X-Gal
Becton Dickinson; Cockeysville, USA	Triptona, Extracto de Levadura, Tripticasa, Peptona
Biomol; Hamburg*	Fenol saturado con Tris, SDS, Glicerina, DTT, IPTG, HEPES
Calbiochem®; San Diego, USA	Higromicina B
FCM BioProducts; Rockland, USA	SEAKEM® GTG Agarosa
GIBCO BRL Life Technologies; Karlsruhe*	Agarosa, TRIzol®, Sulfato de Geneticina (G418), Penicilina, Estreptomicina
Hybaid, Ashford*	30% Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1)
JRH Biosciences; Lenexa, USA	Mezcla de Vitaminas- Tween 80 de Diamond (40X)
Nestle, Frankfurt	Leche en Polvo (Glücksklee)
Pierce Chemicals; Rockford, USA	BCA Protein Assays
Roche Diagnostics; Mannheim*	Glutation reducido, ATP, Ampicilina
Serva Electrophoresis; Heidelberg*	EDTA, APS

Los reactivos no especificados aquí fueron de las marcas comerciales Merck (Darmstadt*) y Sigma-Aldrich (Taufkirchen*).

* Significa que fueron comprados en la sucursal de dichas empresas con sede en la ciudad citada, en Alemania.

2.1.2 Enzimas e inhibidores

Amersham Pharmacia Biotech; Freiburg*

Enzimas de restricción, Taq-polimerasa, T4-DNA-Ligasa, Inhibidor de RNasa, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase).

GIBCO BRL Life Technologies; Karlsruhe*

Super Script TMII, Transcriptasa Reversa, RNasa II, Desoxiribonucleasa I grado amplificación, Oligonucleótidos.

Promega; Madison, USA

Fragmento Klenow de DNA Polimerasa I

Roche Diagnostics; Mannheim*

Pwo-Polimerasa, RNasa H

Sigma-Aldrich; Taufkirchen*

E-64

Para las digestiones enzimáticas realizadas, ligaciones y reacciones de secuenciación, se utilizaron los amortiguadores y las recomendaciones señaladas por las casas comerciales.

2.1.3 Reactivos inmunológicos

DAKO

Inmunoglobulinas de cerdo anti conejo conjugadas con peroxidase. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.4 Marcadores

Roche Diagnostics; Mannheim*

Marcadores de peso molecular: DNA-Marker V y VI

MBI Fermentas; St. Leon-Roth

Marcador de DNA GeneRuler™ 1 Kb

Biorad; München*

Marcadores estándar de rango bajo para SDS-PAGE preteñidos

Invitrogen

Marcadores estándar multicoloreados MultiMark™

GIBCO BRL.; Paisley, Escocia

Marcadores para RNA Low y High

2.1.5 Otros materiales

Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA	Columnas MicroSpin™ S-300 HR Sistema de detección: ECL+Plus™ Western blotting detection reagents, película: Hyperfilm™ECL
Applied Biosystems; Weiterstadt*	Membrana de PVDF: ProBlot™, Kit para secuenciación: Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit
Becton Dickinson; Franklin Lakes, USA	Botellas de poliestireno para cultivo (50 y 250 ml)
Boehringer; Mannheim*	DNA Tailing Kit, ampicilina
Eastman Kodak; Rochester, USA	Película X-OMAT™AR
Eurogentec; Seraing, Belgium	Cuvetas para electroporación
GIBCO BRL Life Technologies; Karlsruhe*	Membrana de nylon Biodyne
Invitrogen; Groningen, Holland	Kit para clonación: TOPO™ TA Cloning® Kit, células competentes: Top 10 One Shot™ Kit, Kit para extracción de DNA: Easy DNA™ Kit
Millipore; Bedford, USA	Filtros esterilizados Sterivac™
Promega Corporation; Madison, WI, USA	Kit para marcaje de DNA: Promega Random Priming Kit
QIAGEN; Hilden*	Kit para minipreparaciones de DNA: Miniprep Kit, Kit para extracción de DNA a partir de geles: Qiaquick Gel Extraction Kit, Kit para preparación de DNA plasmídico: Qiagen Plasmid Mega Kit
Schleicher und Schuell; Dassel*	Membrana de Nitrocellulosa: Protran BA 85, Papel Whatman.

2.2 Material biológico

2.2.1 Amibas

Para el presente trabajo se utilizaron las cepas HM-1:IMSS de *Entamoeba histolytica* (Diamond, 1968) y la cepa [P-1 de *Entamoeba invadens*. Todas las cepas fueron mantenidas en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 (Rengpien y Bailey, 1975).

2.2.2 Bacterias

A menos que sea indicado, las cepas de *Escherichia coli* se obtuvieron del cepario del Departamento de Parasitología Molecular del Instituto Bernhard Nocht (Hamburg, Alemania).

Top 10 y Top 10 F⁺

One Shot™

F-*mcr* (*mrr-hsd RMS-mcr* BC) 80 *lacZ*M15, *lac* X74, *deoR*,
rec A1, *ara* D139 (*araleu*) 7697, *gal* K, *gal* U, *rps* L(StrR),
end A1 *nup* G (Invitrogen).

Se usaron para la transformación con el vector PCR^R 2.1 Topo modificado con las secuencias de *E. histolytica* deseadas.

DIIS α

Φ80dlac ZΔM15, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1 *hsd*R17 (*r_k*, *m_k*),
*sup*E44, *rel*A1, *deo*R, Δ(*lacZYA-argF*)U169, (Hanahan, 1983).

Se usó para la transformación con los plásmidos pBS o PCR 2.1

XL1-Blue MRF⁺

Δ(*mcr*Δ)183 Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 *end*A1 *sup*E44 *thi*-1
*rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac* [F'*pro*AB *lac*I^qΔM15 Tn10(*tet*^r)].
(Stratagene).

Se usó como cepa hospedadora del bacteriófago lambda ZAP (en el cual está construida la biblioteca de DNA genómico de *E. histolytica*). Esta cepa se utilizó también para la titulación, propagación y tamizaje de la biblioteca.

XL0LR $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-}hsd\text{SMR-mrr})173 \text{ endA1 } thi-1 \text{ recA1 } gyrA96 \text{ relA1 } lac$ [F'*proAB lacI^q*ZAM15 Tn10(*tet^r*)] Su⁻ (nonsuppressing) λ^R (lambda resistant).
Se usó como cepa hospedadora del vector plasmídico pBK

BL21 (DE3) F'*dcm ompT hsdS*(*B⁻ mB⁻*)gal, λ (DE3), (Stratagene).
Esta cepa se usó en los ensayos de expresión de las EhChS clonadas en el vector de expresión pHisT7.

BL21 (DE3) pLysS F'*dcm ompT hsdS*(*B⁻ mB⁻*)gal, λ (DE3) [pLysS Cam^r], (Stratagene).

Tanto BL21(DE3) como BL21(DE3)pLysS son cepas que por medio de una fácil inducción (promotores inducibles por IPTG), permiten altos niveles de expresión de proteínas clonadas en vectores que están bajo la acción del promotor T7. Estas cepas de *E. coli* carecen tanto de la proteasa iónica como de la proteasa de membrana externa (*ompT*) las cuales pueden degradar proteínas durante la purificación.

La cepa BL21(DE3)pLysS presenta un mayor control de la expresión de proteínas tóxicas.

2.2.3 Vectores de clonación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Al igual que las bacterias, los plásmidos se obtuvieron a partir de stocks preservados en el Departamento de Parasitología Molecular del Instituto Bernhard Nocht, a menos que otra cosa sea indicada.

2.2.3.1 PCR^R 2.1 (TOPOTMTA Cloning Kit, Invitrogen)

Estos vectores se usaron para clonar los fragmentos obtenidos por PCR a partir de DNA genómico de amibas, tanto para su preservación como para la determinación de la secuencia de dichos fragmentos.

2.2.3.2 pBK-CMV

pBK-CMV es el vector plasmídico resultado de la escisión *in vivo* del fragmento de DNA contenido en el bacteriófago λ -ZAP[®]Express. El vector pBK-CMV contiene el gen de resistencia a neomicina para la selección bacteriana y para resistencia al antibiótico G418 en sistemas de células eucariotas.

El sitio de clonación múltiple de pBK está colocado en posición “río abajo” del promotor LacZ en el extremo amino terminal de la porción de α -complementación del gen de la β -galactosidasa, permitiendo el tamizaje por color (azul/blanco) de clonas con inserto. Dicho *polylinker* tiene 17 sitios de clonación únicos flanqueados por los promotores T3 y T7, tiene además 3 sitios para *primers* estándar que facilitan la secuenciación del DNA.

2.2.4 Vectores de expresión

2.2.4.1 pJC45

El vector plasmídico pJC45 fue diseñado por Joachim Clos (Derivado de pJC40; Clos y Brandau; 1994): plásmido que consta de 2400 pb, es regulado por la actividad del promotor T7 y el operador *lac*; contiene los sitios de restricción *Xba* I, *Nco* I, *Nde* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Xho* I, *Bam* HI, *Sma* I y *Apa* I.

2.2.4.2 pHisT7

Para la construcción del vector pHisT7, el vector de expresión procariota pAR33040 previamente descrito por Rosenberg y col. en 1987, fue modificado de manera tal que un fragmento de DNA que codifica para 8 residuos de histidina fue introducido adyacente al sitio de inicio de la traducción; favoreciendo así la posterior purificación de las proteínas recombinantes expresadas en dicho vector por medio de cromatografía de afinidad para quelación con níquel (cf. ref. Lotter *et al.*, 1992). Otra característica del vector es la presencia de sitios de inserción/restricción *Bgl* II, *Eco* RI y *Bam* HI.

2.2.5 Bibliotecas de DNA genómico construida en el bacteriófago λ

El genoma de bacteriófago λ es una doble hélice de DNA de aproximadamente 50 Kb. Tiene extremos cohesivos de 12 nucleótidos de cadena sencilla complementaria.

Después de que entra a la bacteria huésped, los extremos cohesivos se asocian por apareamiento para formar una molécula circular con 2 muescas (nick's) inestables, separados por 12 nucleótidos.

Estas muescas son selladas rápidamente por la DNA ligasa del huésped para dar una molécula de DNA circular cerrada que sirve como templado para la transcripción durante la fase temprana de la infección.

Durante esta fase, se seguirá una de las siguientes opciones:

- Varios ciclos de replicación del DNA circular, durante el crecimiento lítico. Durante este proceso se sintetiza un gran número de genes del fago y las partículas fágicas que constituyen la progenie son ensambladas. La célula huésped se lisa, liberando a las nuevas partículas virales, las cuales son infecciosas.
- Durante el crecimiento lisogénico, el genoma del fago infectante se integra al DNA de la bacteria huésped por recombinación sitio-específica y es replicado subsecuentemente y transmitido a la progenie bacteriana como cualquier gen cromosómico.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.5.1 Biblioteca de DNA de *Entamoeba histolytica* construida en el bacteriófago lambda ZAP[®]Express (Stratagene)

El vector λ ZAP[®]Express permite tanto la expresión de sistemas eucariotas como de sistemas procariontas, tiene una alta capacidad de clonación, y además presenta 12 sitios únicos de clonación en los cuales se pueden insertar fragmentos de DNA de un tamaño de 0 a 12 Kb. Los sitios de clonación son *Apa* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Kpn* I, *Not* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I, *Spe* I, *Xba* I y *Xho* I. Los fragmentos clonados en λ ZAP[®]Express pueden ser cortados para generar clones en el vector plasmídico pBK-CMV resistente a kanamicina.

Para la construcción de la biblioteca, el DNA de *E. histolytica* cepa HM-1:IMSS se sometió a una digestión parcial previa con la enzima de restricción *Sau* 3A, y los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector λ ZAP[®]Express.

2.2.5.2 Biblioteca de DNA de *Entamoeba invadens* construida en el bacteriófago λ EMBL 4

Para esta parte del trabajo se utilizó una biblioteca donada por el Dr. Daniel Eichinger de la Universidad de Nueva York, NY; USA, que fue construida en el bacteriófago λ EMBL 4 a partir del DNA de *E. invadens* digerido parcialmente con *Sau* 3A antes de su clonación en el vector. Los fragmentos producto de la digestión se insertaron en el sitio *Bam* HI del bacteriófago.

Características del vector:

Los vectores EMBL son vectores de re-emplazamiento usados para clonar fragmentos grandes (hasta 20 Kb) de DNA genómico. Estos vectores son particularmente usados para la clonación de fragmentos de digestiones parciales con *Sau* 3A, como los sitios *Bam* HI en los vectores están flanqueados por sitios *Eco* RI y *Sal* I los fragmentos clonados pueden por lo tanto ser escindidos de las recombinantes por digestión con *Sal* I o *Eco* RI. Las recombinantes son Spi[®] y por lo tanto pueden ser seleccionados en un hospedero P2-lisogénico.

La secuencia en el sitio de policlonación es:

GGAICTGGGTCGAC GGATCC GGG GAATTC CCAGATCC
Sal I *Bam* HI *Eco* RI

En EMBL 3 y EMBL 3A, los sitios de policlonación y stuffer son como sigue:

Sal I, *Bam* HI, *Eco* RI-stuffer-*Eco* RI, *Bam* HI, *Sal* I; mientras que en EMBL 4 los sitios de policlonación son reversos: *Eco* RI, *Bam* HI, *Sal* I-stuffer- *Sal* I, *Bam* HI, *Eco* RI. Así, los fragmentos clonados en EMBL 4 solo pueden ser escindidos por digestión con *Eco* RI.

2.3 Composición y preparación de los medios de cultivo

2.3.1 Medio TYI-S-33

Para la preparación del medio TYI-S33 (Rengpien y Bailey, 1975) los siguientes componentes: tripticasa, 20 g; extracto de levadura, 10 g; glucosa, 10 g; NaCl, 2 g; K₂HPO₄, 1 g; KH₂PO₄, 0.6 g; L-cisteína, 1 g; ácido ascórbico, 0.2 g; y citrato férrico de amonio, 22.8 mg; se disolvieron con agua bidestilada. El pH se ajustó a 6.8 con NaOH 5 M y se aforó a 800 ml con agua desionizada. El medio se trasvasó a frascos de borosilicato de 1 L de capacidad y se esterilizó por presión con calor húmedo a 15 Lb/pulg² durante 15 min. El medio se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

Inmediatamente antes de usarse para el cultivo de amibas, a cada frasco con 800 ml de medio se agregó 150 ml de suero de bovino (Sigma) descomplementado 2 veces por calentamiento a 56 °C en baño de agua, 30 ml de la mezcla de vitaminas/Tween 80 de Diamond, 0.2 g de estreptomina y 2×10^5 U de ampicilina, se esterilizó por filtración (0.22 µm) y se guardó a 4 °C; el medio se usó para cultivo con no más de 8 días de haber sido completado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.3.2 Medio LG (TYI-S33 sin Glucosa)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El medio LG (*Low Glucose*; Vázquezdelara-Cisneros y Arroyo-Begovich, 1984) se preparó de la misma manera que el TYI-S-33, sólo que al LG no se le añadió glucosa. Se aforó al volumen deseado y se esterilizó por filtración. Para este último paso se usaron filtros con poros de 0.22 µm de diámetro (Millipore, Bedford MA. USA). El medio LG se almacenó a 4 °C hasta su uso.

2.3.3 Medio LB y LB-Agar

Se preparó disolviendo 30 g de medio LB o 32 g de medio LB-agar (GibcoBRL; Paisley, Escocia) en agua bidestilada, se aforó a 1 L y se esterilizó por calor húmedo en autoclave (15 lb/pulg² de presión durante 15 min). El medio se guardó a 4°C hasta su uso.

Cuando fue necesario, antes de su uso el medio se adicionó con 100 µg/ml de ampicilina.

2.4 Composición y preparación de las soluciones

A menos que otra cosa este indicada, en la preparación de todas las soluciones se utilizó agua bidestilada, se esterizaron por calor húmedo (15 Lb/ pulg² de presión durante 15 min) y se usaron en los experimentos a una concentración final de 1X por dilución de la solución madre con agua bidestilada.

2.4.1 Soluciones estándar

Para la preparación de las soluciones se siguieron las indicaciones descritas por Sambrook *et al.*, 1989.

IPTG

Se disolvieron 2 g de IPTG en 8 ml de agua. Se ajustó el volumen de la solución a 10 ml con agua y se esterilizó por filtración con membranas desechables de 0.22 µm. Se almacenó en alicuotas de 1 ml a -20°C.

X-gal

Se disolvieron 20 mg de X-gal/ml de dimetilformamida, en tubos de vidrio o polipropileno y se cubrió con papel aluminio para protegerla de los daños ocasionados por la luz. Se almacenó a -20°C.

Ampicilina

Se disolvieron 50 mg de ampicilina en 1 ml de agua, se esterilizó por filtración (0.22 μ m) y se almacenó a -20°C.

Tetraciclina

Se disolvieron 5 mg en 1 ml de etanol, se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C.

Calcoflúor White M2R 0.01%

Se disolvió 1 mg de calcoflúor white M2R en 10 ml de PBS. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Solución de Denhardt

2% de Ficoll; 2% de Polivinilpirrolidona; 2% de BSA; en agua bidestilada.

Solución de pre-hibridación e hibridación (Southern Blot)

Se mezclaron 50 ml de Formamida; 25 ml de SSPE 20X; 10 ml de solución de Denhardt's 50X; 1 ml de SDS al 20%; 14 ml de H₂O bidestilada; 1 ml de Esperma de salmón (10 mg/ml). Se usó sin esterilizar.

Solución de lavado para Southern Blot (2X SSC/0.1% SDS)

Se mezclaron 100 ml de la solución stock SSC 20X con 5 ml de la solución de SDS al 20% y se aforó a 1000 ml con H₂O bidestilada.

2.4.2 Soluciones amortiguadoras

SM (1X)

NaCl	5.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 g
Tris-HCl (pH 7.5)	50 ml
Gelatina 2%	5 ml

PBS (10X)

NaCl	750 mM
Na ₂ HPO ₄	570 mM
KH ₂ PO ₄	180 mM

TBS (10X)

Tris-HCl (pH 7.2)	100 mM
NaCl	1.5 M

TE (10X)

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
EDTA (pH 8.0)	5 M

TBE (10X)

Tris	0.89 M
Acido bórico	0.89 M
EDTA (pH 8.0)	25 mM

TAE (10X)

Tris-Acetato	400 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

SSC (20X)

NaCl	3 M
Citrato de sodio pH 7.0	0.3 M

MOPS (10X)

MOPS	200 mM
Acetato de sodio	50 mM
EDTA	20 mM
pH 7.0 con NaOH.	

HEPES (10X)

HEPES	10 mM
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄	1 mM

HEPES (1X)

HEPES (Sol. madre)	100 ml
H ₂ O bidestilada	896 ml
CaCl ₂ (1M)	4 ml
Esterilizar por filtración.	

Glucosa 10 mM
PH 7.0 con NaOH, Esterilizar por filtración.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPS (10X)

CAPS	22.13 g
H ₂ O	800 ml
pH = 11 con NaOH;	
Aforar a 1 L con H ₂ O	

CAPS-Blotting Buffer

CAPS (10X)	100 ml
Metanol	100 ml
H ₂ O Destilada	800 ml

Buffer de Muestra para RNA

MOPS (1X)	72 μ l
Formaldehido (37% v/v)	128 μ l
Formamida	360 μ l

Colorante para RNA (RNA-Dye)

Glicerina	50% (v/v)
EDTA, pH 8.0	1 mM
Azul de bromofenol	0.25% (w/v)
Xylencyanol	0.25 % (w/v)

Buffer de corrida 6X (para DNA)

Azul de bromofenol	0.25 %
Xylencyanol	0.25 %
Glicerol	40 %

Buffer de corrida (10X) p' PAGE

Tris base	250 mM
Glicina	1.9 M
SDS	1 %

Buffer de muestra para PAGE

Tris	1.52 g
Glicerol	20 ml
SDS	2 %
Disolver en 40 ml H ₂ O,	
pH =6.8 con HCl;	
Azul de Bromofenol	2 ml
Aforar a 100 ml con H ₂ O.	

Buffer de muestra -SDS 2X

Tris-HCl (pH 6.8)	50 mM
Glicerina	12 %
SDS	4 %
β -mercaptoetanol	2 %
Serve Blue G	0.01 %

Buffer de Separación para PAGE

(4X Tris/SDS pH 8.8)

Tris base	1.5 M
SDS	0.4 %
Disolver en 300 ml H ₂ O dest,	
pH =8.8 con HCl;	
Aforar a 500 ml con H ₂ O	
Esterilizar por filtración.	

Buffer de Inmersión para PAGE

(4X Tris/SDS pH 8.8)

Tris base	500 mM
SDS	0.4 %
Disolver en 300 ml H ₂ O dest,	
pH =6.8 con HCl;	
Aforar a 500 ml con H ₂ O	
Esterilizar por filtración.	

Solución colorante de Coomassie

Metanol	50 %
Azul brillante de Coomassie	0.05 %
Acido acético	10 %
H ₂ O destilada	40 %

Solución decolorante de Coomassie

Metanol	45 %
Acido acético	10 %
H ₂ O destilada	45 %

Acrilamida/Bisacrilamida

Acrilamida	29.1%
bisacrilamida	0.9%
(30% T, 3% C)	

Buffer de corrida Mighty Small (10X)

Tris	121 M
Glicina	75 M
SDS	1 %

Buffer de solubilización -Proteínas

TrisHCl	50 mM
CaCl ₂ (pH 7.4)	10 mM
Octyl glycosil	2 %
(n-Octyl-β-D-glucopyranosid)	

PBS-Tween o TBS-Tween

PBS o TBS	adicionado con
Tween™20	0.1 %

Tinción con plata

Solución 1

Etanol	30%
Acido acético	10%

Solución 3

AgNO ₃	0.1 %
Formaldehido	0.02 %

Solución 2

Etanol	20 %
Acetato de sodio	0.5 M
Glutaraldehido	0.5 %
Na ₂ S ₂ O ₃	0.2 %

Solución 4

Na ₂ CO ₃	2.5 %
Formaldehido (pH 11.3– 11.8)	0.01% [®]

Solución 5

EDTA	0.05 %
------	--------

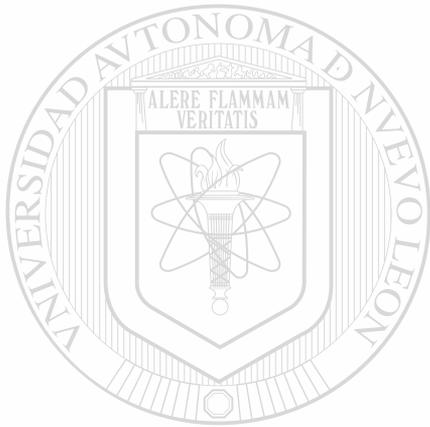
Cyto-Mix (Buffer de electroporación)

KCl	120 mM
CaCl ₂	0.15 mM
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7.6)	10 mM
HEPES	25 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	5 mM
PH=7.6 con KOH	

Cyto-Mix Completo

Inmediatamente antes de su uso:

Cyto-Mix	8 ml
ATP	20 mg (4 mM)
Glutación	24 mg (10 mM)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3 MÉTODOS

3.1 Cultivo de amibas

Para el mantenimiento de los cultivos amibianos se usó de manera rutinaria el medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978). Los cultivos se realizaron en botellas para cultivo de tejidos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) de 70 ml de capacidad (o de 250 ml de capacidad, cuando sea indicado).

3.1.1 Cultivo de *Entamoeba histolytica*, cepa HM-1:IMSS

Antes de cada resiembra, los cultivos axénicos de *E. histolytica* se observaron en un microscopio invertido (Zeiss; Zeiss, Alemania) para comprobar el buen estado morfológico y la movilidad de las amibas. De los cultivos observados se escogió el que presentara la mejor apariencia (monocapa confluyente, movilidad, ausencia de partículas sedimentadas), de la botella seleccionada se eliminó por decantación el medio de cultivo (las amibas en buen estado se mantienen adheridas a la superficie de la botella), se agregaron aprox. 20 ml de medio y se incubaron sobre hielo por 10 min al término de los cuales el cultivo se homogenizó por inversión suave de la botella (5 a 6 veces). De esta suspensión de amibas se tomó aprox. 1 ml para inocular cada una de 2 nuevas botellas llenas con medio TYI-S-33 completo. Los cultivos se incubaron a 37 °C; a los 3 días, cuando las amibas se encuentran en el segundo tercio de su fase logarítmica de crecimiento, se realizó la siguiente resiembra.

3.1.2 Cultivo de *Entamoeba invadens*, cepa IP-1

El cultivo de esta especie se realizó de la misma manera que el de *E. histolytica*, en medio TYI-S-33. Las resiembras se realizaron cada 5 días (segundo tercio de su fase logarítmica de

crecimiento) o hasta que el cultivo alcanzara la confluencia. El procedimiento para el mantenimiento de la cepa fue el mismo que para *E. histolytica* solo que los cultivos se incubaron a 23 °C.

3.2 Enquistamiento

3.2.1 Enquistamiento de *E. histolytica*

El proceso de enquistamiento de *E. histolytica* se hizo de acuerdo al método descrito por Campos-Góngora y col. (2000) con ligeras modificaciones; brevemente: los cultivos de *E. histolytica* (cepa IIM-1:IMSS) fueron crecidos hasta su fase de crecimiento logarítmico en medio TYI-S-33; una vez alcanzada la confluencia de los cultivos, se eliminó el medio por decantación y se agregó medio fresco suplementado con MgCl₂, MnCl₂ y CoCl₂ a una concentración final en el medio de 4, 10 y 10 mM, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 o 48 h al término de las cuales las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con PBS. Previo al tratamiento para la extracción de RNA o de proteínas, en las células obtenidas se determinó la presencia de quitina por tratamiento con calcoflúor white M2R (0.01% en PBS) y observación al microscopio bajo luz UV.

Para los ensayos de Northern blot y de transcripción reversa, la extracción del RNA de los cultivos en proceso de enquistamiento se realizó a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después de iniciado el proceso.

3.2.2 Enquistamiento de *E. invadens*

El enquistamiento de la cepa IP-1 *E. invadens* se hizo en medio LG (Low-Glucose) siguiendo el método descrito por Vázquezdelara-Cisneros y col. (1984).

3.3 Obtención de DNA genómico de amibas

La extracción de DNA genómico se hizo con el Kit “Easy DNA” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente:

Obtención de trofozoitos.

A partir del cultivo de amibas en una botella de 250 ml, crecida hasta monocapa confluyente se obtuvo el material biológico. Se eliminaron por decantación aprox. 200 ml del medio, el cultivo amibiano en el medio restante se enfrió por 10 min a 4 °C, se homogeneizó por inversión y se transfirió a tubos Falcon de 50 ml, la botella se enjuagó con aprox. 50 ml de PBS 1X, las células se obtuvieron por centrifugación a 400 × g por 5 min a 4 °C. El medio se eliminó por decantación y la pastilla celular se resuspendió en 200 µl de PBS 1X; de esta resuspensión celular se hicieron alícuotas de 200 µl en tubos de 1.5 ml.

Extracción del DNA genómico.

A cada tubo con 200 µl de amibas se adicionaron 350 µl de solución A (solución de lisis) se mezcló por agitación vigorosa (con vortex) y se incubó por 10 min a 65 °C. Se agregaron 150 µl de sol. B (sol. de neutralización) e inmediatamente después se agitó vigorosamente con vortex. Se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló con ayuda de un vortex hasta homogeneidad de la mezcla se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf (Eppendorf-Netheler Hinz GmbH; Hamburg, Alemania). Después de la centrifugación la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se procedió a la precipitación del DNA.

Precipitación del DNA.

A cada tubo se le agregó 1 ml de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C y se incubó a 4 °C por 30 min. Se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se eliminó por succión. Se agregaron 500 µl de una solución de etanol al 70% (a -20 °C), se mezcló invirtiendo los tubos 3 a 5 veces y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. El etanol se eliminó por succión, se centrifugó 2 min más para precipitar el etanol residual el cual se eliminó posteriormente por succión; la pastilla así obtenida se dejó secar por 5 min a temperatura de

laboratorio. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de solución amortiguadora TE IX, se adicionaron 4 μ l de RNasa (2 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 60 min. Las muestras se almacenaron a 4 °C para su uso inmediato o a -20 °C para almacenarlas por tiempos largos.

Cuantificación del DNA.

La calidad del DNA se analizó en un gel de agarosa al 0.7% en TBE y la concentración se determinó con ayuda de un espectrofotómetro; para ello, 2 μ l de DNA se diluyeron con 198 μ l de agua bidestilada (dilución 1:100), se mezcló por agitación breve con vortex y se determinó la densidad óptica (DO) a 260 y 280 nm. Para obtener el valor de la concentración, el valor de la DO₂₆₀ se multiplicó por un factor de 5 con lo que se obtiene directamente la concentración de la muestra en μ g/ μ l.

3.4 Análisis de secuencias de ChS reportadas en bancos de datos.

Identificación de secuencias consenso

Cuando no se tiene información sobre la proteína en estudio de una especie dada, pero se conoce la de la proteína homóloga en otras especies, se pueden utilizar en el tamizaje sondas heterólogas de la especie conocida, o diseñar oligonucleótidos a partir de secuencias consenso en las proteínas homólogas conocidas, suponiendo que la secuencia de nucleótidos o aminoácidos está conservada de la misma manera que lo está la actividad de dicha proteína.® De acuerdo con lo anterior, para llevar a cabo la estrategia planteada, se hizo la búsqueda y el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de quitina sintasas obtenidas a partir de los bancos de datos.

Para obtener las secuencias, se usaron las páginas de Internet del GenBank:

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html

A partir de las secuencias aminoacídicas obtenidas se hizo el alineamiento con ayuda de los programas ClustalW (EMBL) y BLAST (NCBI) y se identificaron las regiones consenso de las proteínas.

3.5 Diseño de los iniciadores (oligonucleótidos)

Sobre las regiones consenso, previamente identificadas, se diseñaron oligonucleótidos degenerados para lo cual se tomaron en cuenta los resultados del trabajo de Tannich y Horstmann (1992), en el que se menciona la preferencia en el uso de codones en el género *Entamoeba*. Así, se diseñaron 8 oligonucleótidos degenerados (en orientación *sense* y *antisense*).

3.6 Reacciones de PCR sobre el DNA genómico de *E histolytica*

Utilizando todas las combinaciones posibles de los oligonucleótidos se hicieron ensayos de amplificación con el DNA genómico de *E. histolytica*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para una reacción típica de PCR, a un tubo de polipropileno de 0.5 ml se agregaron cada uno de los componentes y en las cantidades que se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de la reacción típica de PCR sobre DNA genómico de *Entamoeba*

REACTIVO (concentración)	VOLUMEN (μ l)
DNA genómico (10 ng/ μ l)	1
Buffer PCR 10 X/dNTP's (100 mM)	20
Primer Sense (10 pMoles/ μ l)	10
Primer Antisense (10 pMoles/ μ l)	10
DNA Polimerasa (0.5 U/ μ l)	10
Agua bidestilada estéril	49
Total	100

Después se agregaron a cada tubo 100 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras. Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador de la marca Perkin Elmer (Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler), bajo las siguientes condiciones de reacción:

Desnaturalización previa: 94 °C, 2 min; 35 ciclos de PCR que constan de: desnaturalización a 94 °C, 1 min; apareamiento a 45 °C, 1 min; elongación a 72 °C, 1 min; además de un tiempo de elongación de cadena de 15 min a 72 °C, y por último una temperatura constante de 4 °C, hasta su análisis.

Los productos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% usando como buffer de corrida TBE IX. El gel contenía 0.1 μ g/ml de bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta. La electroforesis se realizó bajo una corriente de 70 V. Las bandas de interés se identificaron con base en el tamaño (número de nucleótidos) por comparación con marcadores de talla molecular. Como marcadores de talla molecular se usaron de manera rutinaria el marcador VI (Boehringer, 50 μ g/ μ l) o DNA del fago λ digerido con la enzima *Hind* III (Lambda/*Hind* III, 50 μ g/ μ l).

3.7 Clonación de los productos de PCR en el vector PCR^R 2.1 TOPO

Los productos de PCR obtenidos con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos degenerados que presentaron el tamaño esperado (calculado tomando como referencia el número de nucleótidos de la secuencia de CHS de *D. melanogaster*) se clonaron en el vector PCR^R 2.1 TOPO (TOPOTM TA Cloning[®] Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la posterior transformación de las células Top 10 F' obtenidas comercialmente (Top 10 One ShotTM Kit; Invitrogen), o en la cepa DH5 α de *E. coli*.

Para la clonación se siguieron 2 estrategias dependiendo de si en la reacción de PCR se obtuvo un producto único o varios productos amplificados. Cuando en la reacción de PCR se obtuvo solo un producto (amplicón), para la reacción de clonación se usó 1 μ l del producto de PCR para clonar directamente en el vector PCR^R 2.1. En la segunda estrategia, cuando en el producto de PCR se obtuvieron más de 1 amplicón, los fragmentos de PCR que presentan el

tamaño esperado (calculado con base en la secuencia de la ChS de *D. melanogaster*) se eluyeron a partir de un gel preparativo de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. La electroforesis e identificación de bandas se hizo en las condiciones descritas anteriormente. Para la clusión se usó el kit “Qiaquick Gel Extraction Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA correspondiente a los fragmentos de interés se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para la reacción de clonación de estos fragmentos en el vector PCR^R 2.1 (Invitrogen) se siguieron las instrucciones del fabricante; así, una reacción típica de ligación contiene los componentes y en las cantidades que se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de la reacción de Ligación en el vector PCR^R 2.1 (Invitrogen)

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
DNA Producto de PCR (fresco) ó DNA-Banda eluida	1 ó 5 *
Buffer de Ligación 10 X	1
Vector PCR ^R 2.1 (25 ng/μl)	1
Agua bidestilada estéril	cbp 9
T4 DNA Ligasa (1 U/μl)	1
Total	10

La reacción se incubó a $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para la transformación de las células correspondientes.

3.8 Preparación y transformación de células calcio-competentes, cepas DH5 α y XLORL de *Escherichia coli*

Preparación: Se inoculó una colonia de *E. coli* (DH5 α ó XLORL) en 5.0 ml de medio LB. Se incubó durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación (200 rpm). En matraz de 500 ml se mezclaron 50 ml de medio LB, 500 μl de una solución de maltosa al 20% y 500 μl de una

solución 1 M de $MgSO_4$. Este medio se inoculó con 500 μ l del cultivo preparado la noche anterior y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que el cultivo alcanzó una $OD_{600} = 0.5-0.6$. El cultivo se centrifugó a $2,000 \times g$ por 5 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en 20 ml de una solución 50 mM de $CaCl_2$ frío, se incubó a 4 °C (en hielo) por 30 min. Se centrifugó nuevamente y el sedimento se resuspendió en 5 ml de la solución 50 mM de $CaCl_2$. De esta suspensión celular se hicieron alícuotas de 100 μ l que se guardaron a -70 °C hasta su uso, o se mantuvieron a 4 °C para su uso inmediato con no más de 4 días de preparadas.

Transformación: Para llevar a cabo la transformación de células calcio-competentes se descongeló en hielo un tubo con 100 μ l de células calcio-competentes (que habían estado mantenidas a -70 °C) para cada reacción de transformación. A cada tubo se le agregaron 5 μ l del producto de ligación, se mezcló bien (sin pipetear) y se incubó por 30 min en hielo, después las células se incubaron por 90 seg a 42 °C y posteriormente 3 min en hielo. Luego, a cada tubo se agregaron 900 μ l de medio LB y la suspensión celular se trasvasó a un tubo Falcon de 12 ml, se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 45 min. Después, 300 y 700 μ l del cultivo se distribuyeron con asa bacteriológica sobre placas de LB-agar-ampicilina (100 μ g/ml) previamente adicionadas con 40 μ l de una solución 1 M de IPTG y 40 μ l de una solución al 2% de X-gal. Las placas se incubaron destapadas durante 1 a 2 h a 37 °C para permitir que el líquido se seque y posteriormente se incubaron durante toda la noche en posición invertida.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.9 Selección y análisis de las clonas positivas

Después de la incubación a 37 °C las placas de LB-agar con las bacterias transformadas se incubaron durante 2-3 h a 4 °C para incrementar el contraste de color entre las colonias blancas y azules. Las colonias blancas se aislaron para cultivarlas y analizarlas. Éstas se picaron con asa de plástico o con un palillo estéril y se colocaron en un tubo Falcon de 12 ml para cultivo que contenía 3 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 μ g/ml). Los cultivos se incubaron con agitación (200 rpm) durante toda la noche a 37 °C.

La obtención del DNA plasmídico se hizo por medio de minipreparación, usando el kit Miniprep de Qiagen y siguiendo las instrucciones del fabricante.

El DNA obtenido en las preparaciones (minipreps) se digirió con la enzima de restricción *Eco* R1 para liberar el fragmento clonado en el vector. Los componentes y cantidades necesarios para una reacción típica de digestión a partir del DNA plasmídico obtenido de las minipreparaciones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de una reacción típica de digestión con la enzima *Eco* R1 sobre el DNA plasmídico

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
DNA - Miniprep	4
Buffer de digestión 10 X	2
Enzima <i>Eco</i> R1 (10 U/ μ l)	1
Agua bidestilada estéril	13
Total	20

Las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C por 1 h; pasado este tiempo, 10 μ l del producto de la digestión se mezclaron con 2 μ l del buffer de corrida 6X para su análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X.

El DNA de las clonas positivas portadoras del fragmento clonado (determinado con base en el tamaño del inserto) se secuenció y la secuencia determinada se comparó con la secuencia de quitina sintasas reportadas en los bancos de datos.

3.10 Reacciones de secuenciación de los fragmentos clonados

La determinación de la secuencia de los productos de PCR y DNA genómico se hizo de manera automática por el método modificado de di-desoxy terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) usando el kit de secuenciación cíclica "Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing

Kit[®] (Applied Biosystems), cuyo principio básico es la determinación de la señal emitida por los oligonucleótidos marcados con fluorescencia. La separación del DNA se hizo en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y el análisis de datos se realizó con ayuda de un secuenciador de DNA ABI PRISM[™] 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

Para las reacciones de secuenciación se prepararon 2 tubos que contenían 4 μ l de DNA obtenido de las minipreparaciones de cada una de las clonas (aprox. 1 μ g), 4 μ l de la mezcla de reacción Big Dye Terminator (Terminator Ready Reaction Mix) y 11 μ l de agua grado HPLC, a uno de los tubos se agregó 1 μ l (10 pmol/ μ l) del oligonucleótido M13 *Forward* (F) y al otro 1 μ l del oligonucleótido M13 *Reverse* (R). Cuando fue necesario, los oligonucleótidos M13 F ó R se sustituyeron por oligonucleótidos específicos diseñados de acuerdo con la secuencia previamente determinada.

Las reacciones de PCR para la secuenciación cíclica se realizaron en un termociclador modelo PCR Sprint de la marca HYBAID (HYBAID, Frankfurt, Alemania), usando un programa que consta de 25 ciclos de 10 seg a 96 °C, 5 seg a 50 °C y 4 min a 60 °C por cada ciclo. Para el lavado de las muestras después de la reacción de PCR, a cada tubo se agregaron 80 μ l de H₂O grado HPLC. La muestra se pasó a un tubo de 1.5 ml. Se agregaron 10 μ l de una solución 3M de acetato de sodio, pH 4.6 y 250 μ l de etanol absoluto. Se mezcló con vortex y de inmediato se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con vacío usando una aguja hipodérmica, se lavó con 250 μ l de una solución de etanol al 70% y se centrifugó por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a centrifugar para eliminar los restos de etanol. Después, la pastilla contenida en el tubo se secó por 10 min a 37 °C en una placa de calentamiento. La pastilla se guardó a -20 °C hasta el análisis de su secuencia.

3.11 Análisis y comparación de las secuencias de DNA obtenidas

El análisis de las secuencias de DNA y/o aminoácidos obtenidas se hizo por medio del programa computacional DNA-SYS, y la comparación de las secuencias se hizo por medio del programa BLAST. El cual está disponible a través del National Center for Biotechnology

Information (NCBI). Así se determinó la homología y el porcentaje de similitud de las secuencias de los fragmentos de *E. histolytica* versus la secuencia de las quitina sintasas de otras especies.

3.12 Tamizaje de la biblioteca de DNA de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λ ZAP

Una vez conocida la homología de los fragmentos clonados, el siguiente paso fue usarlos como sonda para hacer el tamizaje de una biblioteca de DNA de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λ ZAP (ZAP Express[®] Predigested Vector Kit de Stratagene).

3.12.1 Preparación de la bacteria XL1-Blue MRF'

La cepa hospedadora del bacteriófago λ ZAP fue la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* crecida en medio LB. La bacteria plaqueante se preparó como se describe a continuación:

En un matraz de 500 ml se mezclaron 50 ml de medio LB, 500 μ l de una solución de maltosa al 20% y 500 μ l de una solución 1 M de $MgSO_4$; se inoculó con una colonia bacteriana crecida previamente durante toda la noche en placa de LB-agar adicionada con 12.5 μ g/ml de tetraciclina. El cultivo se incubó a 32 °C a 180 rpm, toda la noche. Al día siguiente el cultivo se colocó por 10 min en hielo y después se trasvasó a 2 tubos Falcon de 50 ml (25 ml en cada tubo) y se centrifugó por 5 min a 2,000 x g, a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por decantación y los restos del medio se eliminaron por succión. La pastilla de cada tubo se resuspendió en aprox. 25 ml de una solución 10 mM de $MgSO_4$ (para tener una suspensión de bacterias con una $DO_{600} = 1.0$). La suspensión bacteriana se guardó a 4 °C hasta su uso, por no más de 7 días.

3.12.2 Titulación de la biblioteca de DNA de *E. histolytica* construida en λ ZAP

La titulación de la biblioteca se hizo como recomiendan Sambrook y col., (1989). La cepa hospedadora del bacteriófago fue la cepa XLI-Blue MRF' de *E. coli* crecida en medio LB suplementado con maltosa y $MgSO_4$.

3.12.3 Preparación de las placas para el tamizaje de la biblioteca

Para el tamizaje de la biblioteca se usaron cajas de petri de 150 mm de diámetro conteniendo LB-agar. En la primera ronda se usaron 10 placas de LB-agar. Para cada placa 1×10^4 UFP (Unidades Formadoras de Placa) del bacteriófago se mezclaron con 600 μ l de bacteria plaqueante (XLI-Blue MRF' en 10 mM de $MgSO_4$) en un tubo Falcon de 12 ml, la mezcla de fagos y bacterias se incubó por 15 min en un baño de agua previamente calentado a 37 °C, después a cada tubo se agregaron 6.5 ml de top-agar (LB adicionado con 0.7% de agarosa) fundido y mantenido a una temperatura de 56 °C, se mezcló por inversión del tubo (3-4 veces) y la mezcla se vació sobre las placas de LB-agar, se distribuyó bien y se mantuvo a TA para permitir que el Top-agar solidificara; posteriormente las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante toda la noche. Como un control para monitorear la calidad de la bacteria plaqueante, una caja de petri (90 mm de diámetro) se inoculó con 300 μ l de bacteria plaqueante sin bacteriofagos, mezclada con 3 ml de top agar.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.12.4 Preparación de las réplicas de las placas en membranas de nitrocelulosa (Transferencia del DNA)

Después de la incubación de las placas a 37 °C, estas se incubaron a 4 °C por lo menos durante 2 h para tener una mejor solidificación del Top-agar y evitar que éste se desprendiera durante la transferencia del DNA a los filtros de nitrocelulosa.

La transferencia del DNA de las placas del bacteriófago a las membranas de nitrocelulosa se hizo por duplicado siguiendo el siguiente protocolo:

Transferencia del DNA: filtros de nitrocelulosa de 45 μm de tamaño de poro y 132 mm de diámetro (Protran BA 85; Schleicher und Schuell, Dassel, Alemania) se colocaron sobre las placas teniendo cuidado de que no hubiese burbujas entre el filtro y el agar. Para la posterior identificación y orientación de los filtros se hicieron marcas con ayuda de una aguja hipodérmica impregnada con tinta. Para la primer réplica los filtros se mantuvieron durante 1 min sobre las placas de agar-UFP, y para la segunda réplica, durante 2 min. Los filtros se levantaron con ayuda de pinzas y se procedió a la desnaturalización del DNA.

Desnaturalización: los filtros se colocaron durante 2 min en una caja petri que contenía una solución 1.5 M de NaCl / 0.5 M de NaOH. Este paso se repitió 2 veces.

Neutralización: después de la desnaturalización los filtros se colocaron durante 2 min en una caja petri que contenía una solución 0.5 M de Tris, pH 8.0 / 1.5 M de NaCl.

Lavado: los filtros se enjuagaron durante 1 min en una solución 2X de SSC y se colocaron sobre hojas de papel Whatman (Whatman 3 MM).

Unión covalente: la unión covalente del DNA a las membranas se hizo por medio del tratamiento con luz UV. Para ello, cada una de las réplicas se colocaron en el aparato UV Stratalinker™1800, Stratagene (Stratagene; Amsterdam, Holanda) y se aplicó 1 ciclo con una potencia de 1200 kJ.

Después de la transferencia del DNA de las placas de bacteriófagos a las membranas de nitrocelulosa, las cajas de LB-agar que contenían a los fagos (I.B-agar/fagos) se almacenaron a 4 °C.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.12.5 Marcaje de la sonda de DNA con α ^{32}P dATP

Para el marcaje de los fragmentos de DNA usados como sonda, se usó el kit "Random Priming Kit" (Promega) bajo el siguiente protocolo:

En un tubo de 1.5 ml se colocaron 2 a 5 μl de DNA (25-50 ng), el volumen se llevó a 30 μl con agua bidestilada estéril y se calentó durante 5 min a 95 °C para desnaturalizar el DNA. Pasados los 5 min, el tubo se colocó en un recipiente con hielo (4 °C), y después de 10 min se adicionaron 10 μl de solución 5X amortiguadora de marcaje, 2 μl (20 μM) de una solución

mezcla de dNTP's (1:1:1) de cada uno de los nucleótidos, menos el radionúclido correspondiente (dATP), 2 µl de una solución de sero-albúmina de bovino libre de RNasa (10 mg/ml), 1 µl (5 U) del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, y, en el cuarto de radioactividad se agregaron 3 µl de la solución α ^{32}P dATP 50 uCi (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Alemania) (actividad específica: 10 mCi/ml). La mezcla se incubó a 37 °C en placa de calentamiento durante 1 h. Para separar la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados se usó una columna de Sephadex S300 (Columna MicroSpin™S-300 HR). Como primer paso la matriz de la columna se centrifugó con el tapón flojo durante 3 min a 3000 rpm en una microcentrífuga para compactarla. Después se agregó la mezcla que contenía la sonda marcada sobre la matriz de la columna y se colocó la columna dentro de un tubo de 1.5 ml nuevo y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm/3 min, de esta manera los nucleótidos no incorporados quedan atrapados en la matriz de la columna y la sonda marcada se recupera con el sobrenadante. Una manera rápida para monitorear la actividad de la sonda y ver si ésta ha incorporado la marca radiactiva es colocar el tubo que contiene la sonda a una distancia aprox. de 50 cm frente al contador de radioactividad (Geiger); lo mismo se hace con la sonda. La actividad incorporada en la sonda es aprox. la misma cantidad que la retenida en la columna de Sephadex.

Después del marcaje y antes de la hibridación la sonda marcada se desnaturalizó durante 5 min a 95 °C ya sea en un vaso con agua en ebullición o en placa de calentamiento e inmediatamente después se colocó en hielo.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.12.6 Prehibridación de las membranas portadoras del DNA

Mientras se hacía el marcaje de la sonda, se hizo la prehibridación de las membranas que contenían el DNA. Para ello, las membranas se colocaron enrolladas dentro de las botellas de hibridación. Se agregaron aprox. 50 ml de una solución que contenía 0.5 M de Na_2PO_4 / NaH_2PO_4 pH 7.2 y 7% de SDS. Las botellas se colocaron en un horno para hibridación rotatorio (Duo-Therm Oven OV5, Biometra, Göttingen, Alemania) precalentado a 50 °C y se incubaron durante 1-1.5 h aprox., con rotación continua.

3.12.7 Hibridación con la sonda radioactiva

Después de la pre-hibridación y una vez que la sonda estuvo lista se procedió a la hibridación de ésta con el DNA contenido en las membranas de nitrocelulosa. Para ello, la sonda previamente desnaturalizada (5 min / 95 °C), se agregó con ayuda de una pipeta a la botella en la misma solución de pre-hibridación (0.5 M de Na_2PO_4 / NaH_2PO_4 pH 7.2 y 7% de SDS), teniendo cuidado de colocar la sonda hasta el fondo de la botella y mezclarla con la solución de hibridación. Después las botellas se colocaron nuevamente en el horno rotatorio y se incubaron a 50 °C durante toda la noche.

3.12.8 Lavado y exposición de las membranas

La solución de hibridación que contenía la sonda radioactiva se decantó en un tubo Falcon de 50 ml y se guardó a -20 °C previamente etiquetado.

Para el lavado, a cada botella de hibridación se agregaron aprox. 30 ml de solución de lavado que contenía SSC 2X / 0.1% de SDS. Se enjuagó por inversión durante 3 a 4 veces y la solución se eliminó por decantación en un recipiente especial para desechos radioactivos.

Después, las botellas de hibridación que contenían las membranas se llenaron con la solución de lavado y se incubaron a 50 °C durante 5 min. La solución se decantó en un recipiente de plástico y se midió la radioactividad con un contador Geiger (Si había señal de radioactividad en la solución, la membrana se lavaba otra vez durante 20 min a 50 °C). Se hicieron 3 lavados de 20 min cada uno hasta que la cantidad de radioactividad fue mínima en la solución de lavado, monitoreando la cantidad de radioactividad entre cada lavado. Después, las membranas se sacaron de las botellas de hibridación y se colocaron extendidas y húmedas dentro de bolsas de polietileno las cuales se sellaron posteriormente con calor para evitar que las membranas se secan y evitando que quedaran burbujas de aire dentro de las bolsas.

Las membranas cubiertas con polietileno se colocaron en los chasis para exposición a película radiográfica, fijándolas con cinta adhesiva. Los puntos de referencia para orientación de cada una de las membranas se marcaron con marcador de tinta indeleble.

Finalmente, a cada chasis se le colocó una película de papel radiográfico KODAK X-OMAT y se incubó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 3 días al término de los cuales se procedió al revelado de las películas para la identificación de las clonas que presentaron una señal radioactiva.

3.12.9 Identificación y aislamiento de subpoblaciones de fagos (UFP)

Después del revelado de las placas, se identificaron las señales positivas comparando al trasluz las placas radiográficas con su duplicado correspondiente para eliminar los falsos positivos. La identificación de las clonas positivas se hizo alineando cada placa radiográfica con las cajas de plaqueo (LB-agar/fagos) mantenidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, teniendo cuidado de hacer coincidir los puntos de marca lo más exacto posible; las señales positivas se marcaron en cada placa poniendo número a cada señal en orden de intensidad ascendente (la señal más intensa = 1).

Para aislar las placas de fagos positivos, con una punta azul esterilizada colocada en posición invertida se sacó el bocado de agar con la clona seleccionada y se colocó, por expulsión con ayuda de un bulbo, en un tubo que contenía 1 ml de solución SM, y 50 μl de cloroformo. Los tubos estaban marcados con el número de clona, vector y gen que se busca. Los tubos que contenían los bocados con las subpoblaciones de bacteriófagos se mezclaron por vortex ligero y se incubaron por 3 h a TA (1 h con agitación ligera y 2 h sin agitación) o durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación, para permitir la elusión de los fagos del agar. Después del tiempo de incubación la mezcla se centrifugó brevemente (un pulso) y se procedió a determinar el título de cada una de las poblaciones aisladas para posteriormente realizar la segunda ronda del tamizaje.

Para la segunda ronda del tamizaje se plaquearon 1×10^3 UFP de cada una de las subpoblaciones aisladas; cuando fue necesario (hasta tener UFP completamente aisladas) se hizo una tercera ronda plaqueando 1×10^2 UFP de cada subpoblación.

La hibridación, identificación y aislamiento de las clonas positivas en la segunda y tercera rondas se hizo en las mismas condiciones que las usadas en la primera ronda.

3.12.10 Aislamiento de clonas positivas de bacteriófagos

Una vez que se tuvieron UFP completamente aisladas se procedió a picar las clonas aisladas con un palillo estéril. Previamente se preparó una caja con medio LB-agar inoculada con bacteria plaqueante/top-agar e incubada a 37 °C durante 1 h. Por la parte trasera de la caja se marcaron áreas para cada clona. Se levantó cada una de las clonas con un palillo estéril, y con éste mismo se picó 15 a 20 veces la placa de agar para descargar los bacteriófagos. La placa infectada se incubó a 37 °C durante toda la noche en posición invertida.

3.12.11 Escisión *in vivo* del vector pBK-CMV a partir de λ ZAP

Con una punta azul invertida se levantó el bocado que contenía los fagos y se colocó en un tubo que contenía SM-cloroformo. Los tubos se incubaron a TA durante 6 h antes de proceder a la escisión *in vivo* del vector.

Para la escisión *in vivo*, en un tubo Falcon de 14 ml se colocaron 200 μ l de bacteria plaqueante (XL1-Blue MRF⁺), 150 μ l de la solución de SM que contenía los fagos y 1 μ l del Ex Assist Helper Phage (Stratagene), se incubó durante 15 min a 37 °C y se agregaron 3 ml de medio LB. El cultivo se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación (200 rpm). Al día siguiente éste se incubó durante 20 min a 70 °C. Se centrifugó por 20 min a 3000 \times g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se guardó a 4 °C hasta su uso.

3.12.12 Transformación de la cepa XL0LR de *E. coli* con los plásmidos pBK-CMV portadores de la secuencia EhCHS de *E. histolytica*

Para la transformación de la cepa XL0LR de *E. coli* con los plásmidos pBK liberados del bacteriófago λ , 100 μ l del sobrenadante producto de la escisión *in vivo*, se mezclaron con 200 μ l de bacterias XL0LR competentes, se incubó por 15 min a 37 °C en baño de agua y transcurrido este tiempo, se agregaron a la mezcla 300 μ l de medio LB y se incubó una vez

más a 37 °C durante 20 min. Después, toda la mezcla se plaqueó sobre cajas de LB-agar adicionado con 50 µg/ml de kanamicina, las cajas se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Las colonias positivas resultantes se aislaron para su análisis. A partir de cultivos en medio LB-kanamicina, se obtuvo el DNA plasmídico (por medio de mini-preparaciones, en las condiciones previamente descritas) y se procedió a su secuenciación usando para ello los oligonucleótidos T7, T3 o M13 F.

3.12.13 Secuenciación y análisis de los fragmentos de DNA de *E. histolytica* obtenidos de λ ZAP

La secuencia completa de los insertos en las clonas de λ ZAP seleccionadas se determinó por medio de la secuenciación con oligonucleótidos diseñados sobre los extremos de las nuevas secuencias determinadas, o haciendo PCR anidados (*nested-PCR*) con la subsecuente clonación y secuenciación de los productos obtenidos. El análisis de las secuencias se hizo en la forma ya descrita.

3.13 Ensayos tipo Southern blot (Southern EM, 1975)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La extracción del DNA de *E. histolytica* se hizo en las condiciones previamente descritas. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.13.1 Digestión del DNA

Para la preparación de la mezcla de digestión con las enzimas de restricción seleccionadas, se tomaron 80 µg de DNA para cada reacción y se digirieron con 1 µl de enzima (actividad específica: 10 – 20 U/µl) en un volumen total de 40 µl (Tabla 4); la digestión se realizó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, por la mañana, a cada mezcla de reacción con el DNA se agregó 1 µl más de la enzima correspondiente y se dejó incubando hasta completar 24 h de la reacción de digestión.

Tabla 4. Reacción de digestión del DNA para ensayos tipo Southern blot

REACTIVO (concentración)	CANTIDAD
DNA	80 µg
Buffer de reacción 10X	4 µl
Enzima (10-20 U/µl)	1 µl
Agua bidestilada estéril	cbp 40 µl

3.13.2 Electroforesis del DNA

Las muestras de DNA digerido se corrieron en un gel (11.5 × 14 cm) de agarosa al 0.7% en buffer TAE 1X.

Una vez transcurrido el tiempo de digestión del DNA, a cada muestra se agregaron 8 µl del buffer de corrida 6X y el volumen total (48 µl) se colocaron en el gel de agarosa. En el primer carril del gel se colocaron 6 µl del marcador de peso molecular III (*Lambda/Hind III*, 50 µg/µl) y en el último carril el marcador de peso molecular VI (Boehringer, 50 µg/µl). Cuando fue posible se dejó un carril entre los marcadores de peso molecular (PM) y las muestras.

La electroforesis se realizó aplicando una corriente de 30 V durante 1 h, y después una corriente de 18 V durante toda la noche. Al día siguiente, después de 20-24 h de electroforesis, se realizó la tinción del gel en una solución que contenía 500 µl de bromuro de etidio (1 µg/ml) diluido en 500 ml de buffer TAE 1X. La tinción se realizó a TA por 30 min con agitación ligera. El gel se enjuagó por 2-3 min en el mismo buffer de corrida (TAE 1X) tallando suavemente la superficie del gel con la mano enguantada. Posteriormente el gel se irradió durante 3-5 min con luz UV antes de fotografiarlo. Para fotografiarlo, a un lado del gel se colocó una regla con la numeración marcada con pintura fosforescente, el punto cero de la regla se colocó en el punto de inicio de los carriles. Dicha fotografía sirvió como referencia

posterior para determinar el tamaño de las bandas producto de la hibridación con la sonda radioactiva.

Después de fotografiar el gel por duplicado (con el software para fotodocumentación Gel-Doc), se procedió a la desnaturalización del DNA colocando el gel durante 15 min (2 veces) en una solución 0.4 M de NaOH / 1.5 M NaCl.

3.13.3 Transferencia del DNA

Una vez desnaturalizado el DNA se procedió a realizar la transferencia de éste a una membrana de nitrocelulosa (Zeta-Probe Membrane, Bio-Rad); para ello, sobre una "cama" de papel absorbente (aprox. 8 cm de alto) se colocaron 2 hojas de papel filtro Whatman del mismo tamaño que el gel y sobre ellas, se colocó la membrana de nitrocelulosa previamente empapada de la solución de transferencia (8 mM NaOH / 1.5 M NaCl), sobre la membrana se colocó el gel que contenía el DNA que sería transferido y sobre este se colocaron otras 2 hojas de papel Whatman también empapadas en la solución de transferencia. Inmediatamente encima de este sistema se colocó una esponja natural (como reservorio de buffer de transferencia) de las mismas dimensiones que el gel y empapada con la solución de transferencia. La transferencia se realizó aprox. durante 4 h a TA o se dejó durante toda la noche.

Transcurrido el tiempo de transferencia, se hizo la neutralización del DNA colocando la membrana en una solución 0.2 M de buffer de fosfato de sodio, pH=7.4, durante 5-10 min con agitación ligera. Después, la unión covalente del DNA a las membranas se hizo por medio del tratamiento con luz UV aplicando 1 ciclo con una potencia de 1200 kJ en el aparato UV Stratalinker™1800 (Stratagene).

La membrana se guardó húmeda a 4 °C en una bolsa de polietileno sellada con calor hasta su uso en los ensayos de hibridación.

3.13.4 Hibridación tipo Southern blot

Prehibridación.

Para cada membrana se colocaron 30 ml de la solución de hibridación (ver: 2.4.15) en un tubo Falcon de 50 ml, se calentó a 95-100 °C en baño de agua en ebullición durante 5 min, con el tapón ligeramente flojo e inmediatamente se puso en hielo. La membrana que contiene el DNA se sacó de la bolsa de plástico y se empapó en solución de lavado (2X SSC/0.1% SDS), se enrolló y se colocó dentro de la botella de hibridación, después se agregó la solución de hibridación fría y se incubó a 42 °C con rotación por un periodo mínimo de 30 min.

Hibridación.

Para cada membrana, 10 ml de solución de hibridación se hirvieron por 5 min en baño de agua en ebullición y se colocaron en hielo. Mientras tanto, la sonda previamente marcada (ver: apartado 3.12.5) se desnaturalizó por 5 min a 95 °C y se enfrió colocándola de inmediato en hielo. La sonda marcada y desnaturalizada se agregó al tubo que contenía la solución de hibridación y la mezcla se colocó en hielo (4 °C) hasta su uso (aprox. 5-20 min).

De la botella de hibridación que contenía la membrana se eliminó, por decantación, la solución de prehibridación y se agregó la solución de hibridación fría que contenía la sonda marcada; se incubó a 42 °C durante toda la noche en horno rotatorio y al día siguiente se procedió a los lavados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lavados.

La solución de hibridación que contiene la sonda radiactiva se decantó a un tubo Falcon de 50 ml y se guardó a -20 °C debidamente etiquetada.

A la botella de hibridación que contiene la membrana se agregaron aprox. 15 ml de la solución de lavado previamente calentada a 50 °C y se mezcló por inversión (10-12 veces), esta solución se eliminó en un recipiente para radiactividad. Este paso se repitió 2 veces más.

Después las botellas de hibridación se llenaron con solución de lavado y se incubó a 50 °C con rotación, durante 30 min; la solución se eliminó (este paso se repitió una vez más). Entre cada

lavado se hizo el monitoreo de la cantidad de radiactividad (con ayuda del Geiger) tanto en la solución de lavado como en la membrana.

Exposición.

Después de los dos lavados, la membrana se sacó de la botella de hibridación y se colocó en una bolsa de polietileno, se selló con calor y se midió la cantidad de radiactividad que había en la membrana. La membrana cubierta con la bolsa de polietileno se colocó en un chasis para exposición autoradiográfica. Para la exposición, se usó una película de papel radiográfico KODAK X-OMAT. La exposición de la película se realizó durante toda la noche a -70°C . Al día siguiente se procedió al revelado de la película. Cuando la señal obtenida fue tenue, se volvió a montar el chasis con nueva película radiográfica y se expuso durante 2-3 días más.

3.14 Ensayos tipo Northern blot

3.14.1 Obtención del RNA amibiano

Para los ensayos tipo Northern blot se usó RNA de trofozoitos o de amibas en diferentes estadios de diferenciación, incubadas en medio de enquistamiento por (3, 6, 12, 24 y 48 h).

Trofozoitos.

Los trofozoitos en fase de crecimiento logarítmico se obtuvieron de la misma manera que para la extracción de DNA (ver 3.3).

Amibas en proceso de diferenciación (3-48 h).

Se obtuvieron amibas en diferentes grados de diferenciación bajo las condiciones descritas por Campos-Góngora *et al.* (2000), con una sola modificación, que consistió en que para los cultivos y ensayos de enquistamiento se usó medio TYI y no medio PEHPS como medio base. En una serie de ensayos, el medio TYI se suplementó con MgCl_2 4 mM, MnCl_2 10 mM y CoCl_2 10 mM, mientras que en otra serie, se suplementó con MgCl_2 1.22 mM, MnCl_2

14.44 mM y CoCl_2 19.44 mM. Los cultivos se cosecharon a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24 y 48 h) posteriores a la adición de los cationes al medio de cultivo.

Para los ensayos con *E. invadens*, los trofozoítos se obtuvieron a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento bajo las condiciones descritas por Vázquezdelara-Cisneros y col. (1984).

Las amibas se cosecharon por centrifugación y se lavaron con PBS, de la misma manera que las obtenidas para la extracción de DNA.

3.14.2 Extracción del RNA

Inmediatamente después de la cosecha celular se hizo la extracción del RNA total amibiano. Para la extracción del RNA se usó el agente TRIZOL (método modificado de Chomczynski y Sacchi, 1987), de acuerdo con las instrucciones del proveedor (GIBCO BRL, Paisley, Escocia). Brevemente, a cada tubo conteniendo las amibas lavadas con PBS se agregó 1 ml del agente TRIZOL a TA, se mezcló por medio de succión con pipeta y se incubó a TA por 10 min. Después, se mezcló con 200 μl de cloroformo, se centrifugó a $5000 \times g$. Se separó el sobrenadante y el RNA se precipitó con 500 μl de isopropanol. Se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. El RNA precipitado se lavó con etanol al 70% (en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)) y se secó por 5 min a TA. El RNA se resuspendió en 50 μl de agua tratada con DEPC y se almacenó a -20°C hasta su uso.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.14.3 Preparación de las muestras de RNA

Las muestras de RNA total (10 μg) se mezclaron con 28 μl de buffer de corrida para RNA; se incubaron durante 5 min a 60°C e inmediatamente después se agregaron a cada muestra 4 μl de la solución colorante para RNA y 2 μl de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml). Como marcadores de peso molecular se usaron los marcadores *Low* y *High* (GIBCO BRL), los cuales se sometieron al mismo proceso que las muestras de RNA antes de ser depositados en el gel.

3.14.4 Separación del RNA por electroforesis

La separación del RNA (10 µg/linea) se hizo bajo condiciones desnaturalizantes por medio de electroforesis en un gel al 1% de agarosa (SEAKEM®GTG Agarose)/formaldehído (6.7% v/v), usando como buffer de corrida una solución IX de MOPS, como recomiendan Sambrook y col. (1989). La electroforesis se realizó aplicando una corriente de 70 V durante 30 min y posteriormente se continuó durante toda la noche bajo una corriente constante de 18 V. Al día siguiente y antes de realizar la transferencia, se tomó una fotografía del gel (con el software para fotodocumentación Gel-Doc), colocando también una regla con escala fluorescente como se describió en el párrafo 3.13.2.

3.14.5 Transferencia del RNA

El RNA se transfirió a membranas de nylon de 0.2 µm (Pall Biosupport Membranes Biotrans A Transfer Membrane; Pall Europe Limited, Portsmouth England), con el mismo sistema y bajo las condiciones descritas para la transferencia del DNA, solo que para la transferencia del RNA se usó como buffer de transferencia una solución 20X de SSC.

Después de la transferencia, la unión covalente del RNA a las membranas se hizo por medio del tratamiento con luz UV (1200 kJ). La membrana se guardó a 4 °C en una bolsa de polietileno sellada con calor hasta su uso en los ensayos de hibridación.

3.14.6 Hibridación tipo Northern blot

Para la hibridación se usaron como sondas, el gen CHS1 completo (1.9 Kb) y un fragmento de 910 pb del gen CHS2 de la quitina sintasa de *E. histolytica* marcados con ³²P-ATP.

La prehibridación, hibridación, lavados y exposición de las membranas se hicieron en las mismas condiciones que las descritas para la hibridación tipo Southern (3.13.4).

3.15 Ensayos de transcripción reversa (RT)

3.15.1 Obtención del RNA amibiano

Para los ensayos de transcripción reversa se usó el RNA de cultivos celulares obtenidos en las mismas condiciones que para los ensayos tipo Northern blot (ver: 3.14.1 y 3.14.2).

3.15.2 Tratamiento del RNA con DNasa I

Para asegurar que el RNA no estuviera contaminado con DNA, éste se trató primero con DNasa I (GIBCO BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de mezclar los componentes de la reacción indicados en la siguiente tabla, la reacción se incubó durante 15 min a TA.

Tabla 5. Composición de la reacción de digestión para eliminar al DNA como posible contaminante del RNA

REACTIVO (concentración)	VOLUMEN (μ L)
RNA (1 μ g)	2
Buffer para DNase 10X	4
DNasa (1 U/ μ l)	1
Agua bidestilada estéril	3
Total	10

Pasado el tiempo de incubación, al tubo de reacción se agregaron 5 μ l de una solución 25 mM de EDTA, pH=8 para parar la reacción.

3.15.3 Síntesis de cDNA y reacciones de PCR

El cDNA se obtuvo a partir del RNA total por medio de reacciones de transcripción reversa. Para ello, a un tubo de polipropileno de 0.5 ml se agregaron cada uno de los componentes y en las cantidades que se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Composición de una reacción típica de RT sobre RNA total de Entamoeba

REACTIVO (concentración)	VOLUMEN (μ l)
RNA total (1 μ g/ μ l)	1
Buffer 5X	4
DTT (0.1 M)	2
dNTP's (40 mM)	2
Oligo (10 pmoles/ μ l)	2
Transcriptasa reversa SuperScript	0.75
Inhibidor de RNasa	0.25
Agua bidestilada estéril	8
Total	20 μ l

Una vez que se agregaron los componentes mencionados, cada una de las reacciones se incubaron por 45 min a 42 °C y posteriormente durante 10 min a 37 °C.

Para los ensayos de PCR se tomó 1 μ g de cDNA (1.5 μ l) de cada uno de los productos de la reacción de RT. Los oligonucleótidos P9 (GAAATTAAGTTGCGCATTGG) y P10 (AAATTACATACTGCATAAATTGG) específicos para EhCHS1 de *E. histolytica* que fueron diseñados sobre la secuencia del fragmento de DNA de 900 pb se usaron para las reacciones de PCR; estas reacciones se llevaron a cabo usando 15, 20 y 25 ciclos en la

reacción. Los productos resultantes de las reacciones de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior tinción y análisis en las condiciones ya descritas.

3.15.4 Terminación e inicio de la transcripción (RACE-PCR)

Para determinar los sitios de inicio y terminación de la transcripción en los genes EhCHS1 y EhCHS2, se realizaron ensayos tipo RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Con ayuda de este método es posible amplificar el extremo 5' desconocido de los genes a partir del cDNA, el cual es sintetizado a partir del RNA total, por medio de transcripción reversa y con un primer específico para el gen. A partir del cDNA y con ayuda de la enzima transferasa terminal se adiciona una cola del nucleótido deseado. Después se hace un *nested*-PCR con *primers* internos específicos del gen (Frohman, 1993).

Extremo 5'

La síntesis del cDNA correspondiente al extremo 5' del gen EhCHS1 se realizó por medio de transcripción reversa usando como oligonucleótido de anclaje el primer antisentido p17asCHS1 (GAACAGCAAGAGATGAAGCGG) y permitiendo la adición de G en el sitio de inicio de la transcripción por efecto de la actividad de la enzima transferasa terminal (Terminal deoxynucleotidyl transferase), una DNA polimerasa única que no requiere un templado sino que simplemente cataliza la incorporación de nucleótidos trifosfatados al extremo 3'-OH de DNA de cadena sencilla o doble. Para estos ensayos se usó el kit "DNA Tailing Kit" (Boehringer) siguiendo las instrucciones del fabricante. La misma estrategia se siguió para el gen EhCHS2, donde el oligonucleótido de anclaje fue CHS2-5'as24 (CATCATTGGTGCAAAAGTTAATAC).

Para los ensayos de PCR se usaron los oligonucleótidos oligo-dC + CHS1as5' (CTCGGTATGCTTCATATTTATTTC) y oligo-dC + JG13as22 (GGAAACTCACTGACATTTTGTG), para EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. Los oligonucleótidos se diseñaron o se seleccionaron de los ya existentes con base a que ellos hibridizaran con regiones situadas a

aprox. 100-200 pares de bases en posición río arriba o río bajo de los supuestos codones de terminación e inicio, respectivamente.

Extremo 3'

Hacia los extremos 3' de ambos genes, la síntesis del cDNA se realizó usando como oligonucleótido de anclaje el primer antisentido oligo-dT (el cual se une por complementariedad a la cola de poly A del mRNA poliadenilado) y con ayuda de la enzima transcriptasa reversa. Las reacciones de PCR se realizaron usando un oligonucleótido específico para cada uno de los genes (P11 (CCAGTTGTGTGGTTCCTTTTAACACC) para el gen EhCHS1 y BE29s24 (GAATTCATTTTCTTTTATGATTG) para el gen EhCHS2) y como oligonucleótido antisentido, el oligo-dT.

Cada grupo de oligonucleótidos fue usado para amplificar el cDNA de *E. histolytica*. Los fragmentos amplificados fueron subclonados en un vector plasmídico y secuenciados por ambos extremos usando los oligonucleótidos estándar M13F y M13R.

3.16 Clonación de los genes EhCHS en vectores de expresión

3.16.1 Clonación del gen EhCHS1 en el vector pJC45

Para la clonación de los genes de quitina sintasa se usó el vector de expresión pJC45 diseñado por Joachim Clos (ver 2.2.4.1). Para la ligación se decidió usar los sitios de restricción *Nde* I y *Bam* HI ya que éstos no están presentes en el ORF de la secuencia del gen EhCHS1.

El primer paso fue el diseño de 2 oligonucleótidos: oligonucleótido *sense* EhCHS1-*Nde*-s24 (GGCATATGAGTAATCAAGGAGAGG), que además del codón de inicio contiene un sitio de corte para *Nde* I (subrayado) y oligonucleótido *antisense* EhCHS1-*Bam* HI-as25 (GGGGATCCTTAAACTCCTCCTCGTG) conteniendo el sitio de corte para *Bam* HI (subrayado) además del codón de término. Con estos oligonucleótidos el gen completo de la

quitina sintasa fue amplificado por PCR a partir del DNA genómico de *E. histolytica*, subclonado en el vector PCR 2.1 y su secuencia determinada (para comprobar que no hubiese errores en la secuencia).

Las reacciones de amplificación por PCR se hicieron con la enzima Pwo-DNA Polimerasa (Roche) con el objeto de eliminar posibles errores durante la síntesis de DNA; Durante la PCR se usó una temperatura de alineamiento de 56 °C, con 35 ciclos de amplificación.

A partir del vector PCR 2.1 que acarrea el gen EhCHS1, y por digestión con las enzimas de restricción correspondientes (*Nde* I y *Bam* III), separación en un gel de agarosa 0.7% en buffer TAE 1X y purificación por extracción con fenol-cloroformo, se obtuvo el fragmento del gen EhCHS (1.9 Kb). Este se clonó, por medio de una reacción típica de ligación, en el vector de expresión pJC45 digerido previamente con las mismas enzimas.

Para las reacciones de ligación, tanto el DNA de los fragmentos como el DNA plasmídico se cuantificó de manera visual por electroforesis en un gel de agarosa al 1% comparando la intensidad de las bandas con concentraciones conocidas del marcador λ /HindIII. Para cada reacción de ligación se usó una cantidad 3 veces mayor de DNA del inserto, con respecto al DNA del vector. Las reacciones de ligación se incubaron en baño de agua a 14 °C, durante toda la noche. En la siguiente tabla se muestran los componentes y cantidades de la reacción de ligación en los vectores de expresión.

Tabla 7. Composición de una reacción típica de ligación en los vectores de expresión

REACTIVO	VOLUMEN (μ L)
DNA-Vector	2
DNA-Inserto	5
Buffer de Ligación 10 X	1
ATP 10 mM	1
T4 DNA Ligasa (1 U/ μ l)	1
Total	10 μ l

La misma estrategia descrita se siguió para clonar posteriormente el gen EhCHS2 en el vector pJC45, para lo cual se usaron los oligonucleótidos sintéticos EhCHS2-s26-*Nde* I (GGCATATGGCAAACCTTGATACTG) y EhCHS2-as27-*Bam*-HI (GGGGATCCTTACTCTGAATGAGAAAGG).

3.16.2 Clonación de los genes EhCHS en el vector pHisT7

El vector de expresión pHisT7 tiene como característica principal poseer la información necesaria que codifica para que una cola de 8 residuos de histidina (colocada en posición adyacente al sitio de inicio de la traducción) sea traducida al mismo tiempo que la proteína recombinante; esto favorece la posterior purificación de dicha proteína por medio de una columna de afinidad para histidina. Otra característica del vector es la presencia de sitios de inserción/restricción *Bgl* II y *Bam* HI.

Siguiendo la misma estrategia que para la clonación en pJC45, los genes EhCHS1 y EhCHS2 se clonaron en el vector pHisT7: Un fragmento conteniendo la secuencia completa que codifica para el gen EhCHS (desde ATG hasta el codón de término) fue amplificada a partir de DNA genómico; para la amplificación del gen EhCHS1 se usaron los oligonucleótidos EhCHS1-*Bgl*II-s27 (GATCTATGAGTAATCAAGGAGAGGAAA) y EhCHS1-*Bam*HI-as25 (GGGGATCCTTAAACTCCTCCTCGTG) los cuales contenían los sitios de restricción *Bgl* II y *Bam*HI, respectivamente. Mientras que para el gen EhCHS2 se usaron los oligonucleótidos EhCHS2-*Bgl*II-s26 (GATCTATGGCAAACCTTGATACTG) y EhCHS2-*Bam*HI-as25 (GGATCCTTACTCTGAATGAGAAAGG). Después de comprobar que no había errores en la secuencia (por clonación y secuenciación previas en el vector PCR 2.1) los fragmentos correspondientes a los genes EhCHS se obtuvieron a partir del vector PCR 2.1 por digestión con las enzimas *Bgl* II y *Bam* HI, separación en un gel de agarosa 0.7% en buffer TAE 1X y purificación por medio de extracción con fenol-cloroformo. Después se procedió a la ligación de dichos fragmentos en el vector plasmídico pHisT7 previamente digerido con la enzima *Bam* HI.

3.17 Expresión de las proteínas recombinantes en sistemas bacterianos

Como cepa hospedadora para el vector pJC45/EhCHS (que contenía los genes EhCHS) se usó la cepa pAPLac de *E. coli* y como cepas hospedadoras del vector pHIS7/EhCHS se usaron tanto la cepa BL21-DE3 como la cepa BL21-DE3 pLYS de *E. coli*.

La transformación de las cepas calcio-competentes de *E. coli* se realizó bajo las condiciones descritas en el párrafo 3.8.

La selección de las clonas positivas de las cepas de *E. coli* transformadas se realizó en placas de LB-agar adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y con kanamicina (50µg/µl) cuando se trató de la clonas pAPLac/EhCHS.

3.17.1 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes EhChS1 y EhChS2

Después de la transformación de las cepas de *E. coli* con cada uno de los vectores plasmídicos que acarrean el gen de la quitina sintasa, se procedió a la inducción de la expresión de la proteína recombinante. Para ello, 50 ml de medio LB se inocularon con una colonia transformada y previamente seleccionada por crecimiento en una caja de medio LB-agar en presencia de los antibióticos ampicilina y kanamicina. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm y cuando éste alcanza una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.7, la mitad del volumen del cultivo se trasvasó a otro matraz. A uno de los matraces se adicionó el IPTG necesario para tener una concentración final de 0.5 mM. Al otro matraz (control) no se adicionó IPTG. Los cultivos se incubaron por 2 h más y pasado este tiempo se procedió a su cosecha para su posterior análisis.

3.17.2 Obtención de extractos celulares a partir de bacterias transformadas

Un ml de la suspensión celular de cada uno de los cultivos se colocó en un tubo y se separaron la pastilla y el sobrenadante por centrifugación a 14,000 rpm/5 min en una

microcentrifuga. El sobrenadante se eliminó por succión y la pastilla se resuspendió en 300 μ l de una solución de PBS (pH 7.4). Las bacterias se rompieron con ultrasonido. Para ello la suspensión bacteriana se sometió a 5 ciclos de 20 seg cada uno, aplicando una potencia de 75 Watts. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 rpm / 15 min; el sedimento y sobrenadante resultantes se separaron para su posterior análisis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

3.17.3 Análisis de las proteínas recombinantes en geles SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS bajo condiciones desnaturalizantes depende de la masa molecular de cada una de las proteínas (Laemmli *et al.*, 1970). Para la separación de las muestras de proteínas totales bacterianas se usó un gel de poliacrilamida-SDS al 12%.

Preparación de las muestras y electroforesis.

Inmediatamente antes de su separación en SDS-PAGE, las muestras de proteínas se mezclaron con 1 vol de buffer de muestra-SDS y con DTT (concentración final 10 mM), se incubaron por 5 min a 95 °C, e inmediatamente se centrifugó por 1 min a máxima velocidad en una microcentrifuga. Las muestras (12 μ l) se depositaron en el gel y se procedió a la electroforesis. La electroforesis se realizó en una cámara Mighty Small Mini-Vertical Units (Hoefer) en geles de 10 x 10.5 cm, aplicando una corriente eléctrica constante de 18 mA/gel durante 1 h o hasta que el colorante esté saliendo del gel. Como buffer de corrida se usó una solución que contenía 121 M de Tris, 75 M de Glicina y 1% de SDS. Como marcadores de peso molecular se usó la mezcla de marcadores MultiMark™ Multi-colored Standard (Invitrogen).

Tinción del Gel.

Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con el colorante azul brillante de Coomassie. Para ello, los geles se colocaron en un recipiente inmersos en la solución colorante de Coomassie durante 1.5 h a TA, con movimiento moderado. La solución colorante se eliminó y se sustituyó por la solución decolorante de Coomassie, se enjuagaron agitando

durante 2-3 min y se cambió la solución por solución nueva; aquí se incubaron durante 30-60 min hasta que se observó un contraste entre las proteínas teñidas de azul y el fondo claro del gel.

3.18 Transfección de *E. histolytica* con los genes EhCHS

3.18.1 Amplificación de los genes EhCHS por PCR

Ambos vectores (NcoCass and pHygRtet) fueron diseñados para facilitar la clonación de fragmentos acarreando los sitios de restricción *Kpn* I, *Sma* I y *Bam* HI.

La amplificación de los genes EhCHS1 y EhCHS2 se hizo por medio de PCR sobre el DNA genómico de *E. histolytica*; para cada uno de los genes se diseñaron 2 oligonucleótidos acarreando los sitios de restricción *Kpn* I y *Bam* HI hacia los extremos 5' y 3' respectivamente, de la secuencia de los genes EhCHS. Para la amplificación del gen EhCHS1 se usaron los oligonucleótidos EhCHS1-s27-*Kpn* I (GGGGTACCATGAGTAATCAAGGAGAGG) y EhCHS1-*Bam* HI-as25 (GGGGATCCTTAAACTCCTCCTCGTG); y para el gen EhCHS2 los oligos que se usaron fueron EhCHS2-s29-*Kpn* I (GGGGTACCATGGCAAATCCTTGAT ACTG y antisense EhCHS2-*Bam* HI (GGGGATCC TTA CTCTGAATGAGAAAGG).

Los productos amplificados se clonaron en el vector PCR^h 2.1 TOPO y se secuenciaron para comprobar que no hubiese errores en la secuencia de DNA que pudieran cambiar el ORF de los genes. Una vez comprobado lo anterior, los fragmentos correspondientes a cada gen se liberaron por medio de digestión con las enzimas *Kpn* I y *Bam* HI y se eluyeron a partir de un gel de agarosa al 0.7% en Buffer TAE.

3.18.2 Ligación de los genes EhCHS en los vectores de transfección

Después de la purificación de las bandas (por extracción con fenol-cloroformo) se procedió a la ligación de dichos fragmentos en los vectores plasmídicos NeoCass (Hamann *et al.*, 1995), and HygRtetR O Cass (Hamann *et al.*, 1996).

3.18.2.1 Desfosforilación del DNA plasmidico

En una reacción de digestión enzimática se dejan libres los extremos 3' OH- y los grupos fosfato 5' en los sitios de corte, de tal manera que cuando se pretende hacer la ligación de fragmentos extraños es posible que una religación pueda ocurrir, evitando que el proceso de ligación se lleve a cabo en forma satisfactoria.

Para facilitar la ligación de los genes EhCHS1 y EhCHS2 en los vectores plasmídicos, los fragmentos correspondientes a los vectores linearizados con las enzimas *Kpn* I y *Bam* HI se sometieron a un proceso de desfosforilación con ayuda de una fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase=CIAP). En una reacción (vol final 50 µl) que contenía 1U de CIAP y la cantidad de buffer apropiado, el DNA de los vectores se incubó a 37 °C durante 45 min. Al terminó de este tiempo, se realizó una extracción del DNA con fenol-cloroformo para eliminar los restos de la enzima CIAP.

3.18.2.2 Ligación del DNA de los genes EhCHS a los vectores plasmídicos

Después de la desfosforilación, la ligación del DNA de los genes EhCHS en los vectores plasmídicos se realizó con ayuda de la enzima T4-DNA Ligasa (Pharmacia). En la reacción se mantuvo una relación molar 1:3 (DNA-vector:DNA-fragmento); por cada 100 ng de DNA del vector y 300 ng de DNA del fragmento se usó 1 U de la enzima ligasa; la reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se procedió a la transformación de la cepa DH5α de *E. coli* y posteriormente a la selección de las clonas positivas que acarrean el DNA vector-inserto. La selección de las clonas positivas se hizo en placas de LB-ampicilina, digestión enzimática (*Kpn* I-*Bam* HI) y posterior secuenciación del DNA; como se indica en 3.9.

Después de la identificación de las clonas que acarrean el DNA plásmido-inserto tanto del gen EhCHS1 como del gen EhCHS2, se procedió a la preparación de grandes cantidades de DNA-plasmídico de cada una de ellas. La preparación del DNA plasmídico se hizo por medio del

método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), para lo cual se usó el Kit "QIAGEN Plasmid Mega Kit", siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del DNA obtenido a partir del maxi-prep se determinó de la misma manera que como se describe en 3.3.

3.18.3 Transfección de *E. histolytica* por medio de electroporación

La transfección de las amibas se hizo por medio de electroporación siguiendo el protocolo descrito por Nickel y Tannich (1994). Las amibas crecidas en botellas de cultivo (crecimiento hasta 2/3 de monocapa confluyente; aprox. 1×10^7 amibas) se cosecharon lavándolas 2 veces con una solución buffer de NaPBS 1X fría y centrifugación a $430 \times g$ durante 3 min, a $4^\circ C$; después de los lavados con NaPBS, las amibas se lavaron una vez más con 10 ml de la solución incompleta de Cyto-Mix fría (10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7.6), 120 mM KCl, 0.15 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA y 5 mM $MgCl_2$); después de la centrifugación, las amibas se resuspendieron con 3.4 ml de la solución de Cyto-Mix completa (suplementada inmediatamente antes de su uso con 4 mM de ATP y 10 mM de glutation en su forma reducida). Para la electroporación, 800 μl de la suspensión celular (aprox. 2×10^6 células) se mezclaron con 100 μg de DNA plasmídico (100 μl) en una cubeta para electroporación de 4 mm (Gene Pulser® Cuvette, BIO-RAD); se mezcló por inversión 3-4 veces y de inmediato se aplicó una corriente eléctrica de 1200 V y 25 μF (Bio-Rad Gene Pulser™; BIO-RAD) la electroporación se hizo 2 veces; los valores de tiempo constante estuvieron siempre entre 0.3 y 0.4 ms. Inmediatamente después de la electroporación las células se trasvasaron, con ayuda de una pipeta a una botella de cultivo (50 ml) llena con medio TYI-S-33 completo precalentado a $37^\circ C$; se mezcló por inversión ligera y se incubó a $37^\circ C$ durante 48 h.

3.18.4 Selección de las amibas transfectadas

La selección de las amibas transfectadas se inició después de 2 días de incubación: se cambió el medio de cultivo eliminando por decantación el medio viejo y una vez que se agregó el medio nuevo, también se agregó el antibiótico correspondiente dependiendo de

plásmido usado. Así, para la selección de las amibas transfectadas con el vector plasmídico que confiere resistencia a neomicina (Neo Cass) se agregaron 10 µg/ml del antibiótico G418 y para las amibas transfectadas con el plásmido HygtetR O Cass, se usó higromicina a una concentración final de 10 µg/ml. La selección se realizó durante 2-3 semanas (hasta que al término de 2 días, los cultivos fueron capaces de formar una monocapa) cambiando el medio de cultivo-antibiótico cada 2 días.

Después de la selección, los cultivos se mantuvieron en medio TYI-S-33 bajo presión selectiva con el antibiótico correspondiente.

3.18.5 Inducción de la expresión en las amibas transfectadas con HygtetR O Cass/EhCHS

Para inducir la expresión de las proteínas en las amibas transfectadas con el plásmido HygtetR-O-Cass, los cultivos crecidos hasta 2/3 de monocapa (fase de crecimiento logarítmica) se adicionaron con 1 ó 5 µg/ml (concentración final) de una solución de tetraciclina disuelta en etanol. Los cultivos se incubaron durante 48 h más y se procedió a la cosecha de las amibas para los posteriores análisis para la determinación de la sobre-expresión de las proteínas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.19 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes en amibas transfectadas con los genes EhCHS

3.19.1 Preparación de extractos de proteínas de *E. histolytica*

Para la extracción de las proteínas de trofozoitos de *E. histolytica* transfectados, los cultivos amibianos de 10 cajas de cultivo de 250 ml crecidos a monocapa (en fase de crecimiento exponencial) se cosecharon por sedimentación centrifugando durante 4 min a 430 × g, a 4 °C y 2 lavados sucesivos con 50 ml de PBS. La pastilla obtenida (aprox. 2.5 ml) se guardó durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente las amibas se lisaron por el proceso de congelación-

descongelación. Antes de descongelar a cada pastilla de amibas se agregó una cantidad, en proporción 1:30, de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: E 64 (10 mM), Leupeptin (1 mg/ml en H₂O) y PMSF (100 mM) disuelto en etanol; así, para los 2.5 ml de muestra se agregaron 86 µl de E 64, 86 µl de Leupeptin y 43 µl de PMSF, se incubó a temperatura de cuarto por 10 minutos y después se adicionaron 2 volúmenes de PBS/vol. de la pastilla (vol. final aprox. = 8 ml); las muestras se congelaron en una mezcla de hielo seco-etanol. Este proceso se repitió 2 veces más agregando entre cada ciclo una cantidad igual de los inhibidores. Las muestras (aprox. 4 ml/tubo) se colocaron en tubos para centrifuga (Ultra Clear™ Centrifuge Tubes, Beckman), y se centrifugó a 36,000 rpm (150,000 x g) durante 1 h a 4 °C en una centrifuga Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckman (Beckman Instruments; Inc, Palo Alto, CA; USA) equipada con un rotor de ángulo variable SW55Ti. Después de la centrifugación, se separó el sobrenadante de las muestras (Eh-Sn1) y se reunieron todas las preparaciones en un tubo de 10 ml, se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml, y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. La pastilla resultante de la centrifugación se resuspendió en 1 vol. de PBS, se centrifugó nuevamente bajo las condiciones descritas y el sobrenadante (Eh-Sn2) se procesó y guardó de la misma manera que Eh-Sn1.

A la pastilla resultante de la segunda centrifugación (150 µl) se adicionaron 9, 9 y 4.5 µl, respectivamente, de los inhibidores mencionados; se agregaron 750 µl de buffer de solubilización (50 mM de TrisHCl, 10 mM de CaCl₂, pH 7.4) adicionado con 2% (peso/vol.) del detergente octil glicosil (n-Octyl-β-D-glucopyranosid) y ésta se resuspendió con ayuda de una pipeta o usando un gendarme. La mezcla se homogeneizó durante toda la noche a 4 °C con ayuda de una cápsula magnética. Al día siguiente la suspensión se pasó con ayuda de una pipeta a un tubo para centrifuga de 11 x 34 mm (Polyallomer™ Centrifuge Tubes, Beckman) y se centrifugó a 48,000 rpm (150,000 x g) durante 1 h a 4 °C, en una centrifuga Optima™ TL Ultracentrifuge Beckman (Beckman Instruments; Inc, Palo Alto, CA; USA) equipada con un rotor de ángulo variable TLS-55. La pastilla y sobrenadante restantes se separaron; a la pastilla se agregó 1 ml de buffer de solubilización adicionado con 2% de octil glicosil, se resuspendió, se hizo un "pool" del contenido de todos los tubos y se guardó a -70 °C en alícuotas de 1 ml. Con el sobrenadante de los dos tubos se hizo un pool y se adicionaron 2.5 ml de H₂O bidestilada (para reducir la concentración de octil-glicosil a aprox. 0.8% y evitar los problemas

al correr un gel de SDS-PAGE), se mezcló y se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml que se guardaron a -70 °C hasta su uso.

3.19.2 Separación de proteínas de *E. histolytica* en SDS PAGE

Inmediatamente antes de su separación en SDS-PAGE, las muestras de proteínas mantenidas a -70 °C se descongelaron en hielo y las cantidades determinadas se diluyeron en proporción 1:2 (v/v) con buffer de muestra (buffer 5X/SDS 2%) adicionado con 2% de β-mercaptoetanol. Se incubaron por 5 min a 95 °C, e inmediatamente se centrifugó por 1 min a máxima velocidad en una centrifuga. Las muestras (12 µl) se depositaron en el gel y se procedió a la electroforesis.

La electroforesis se realizó en una cámara Mighty Small Mini-Vertical Units (Hoefer) en geles de 10 × 10.5 cm, aplicando una corriente eléctrica constante de 18 mA/gel durante 1h o hasta que el colorante empezó a salir por la parte inferior del gel. Como buffer de corrida se usó una solución que contenía 0.025 M de Tris, 0.192 M de glicina y 0.15% de SDS. Como marcadores de peso molecular se usó la mezcla de marcadores MultiMark™ Multi-colored Standard, (Invitrogen).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®

3.19.3 Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Para la transferencia de las proteínas se usó el sistema “Semi-Dry-Blot System” (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Alemania). Sobre la placa de grafito (cátodo) se colocaron 3 capas de papel filtro (de las mismas dimensiones que el gel) empapadas con Buffer CAPS (1 X); sobre estas se colocó el gel SDS-PAGE con las proteínas, previamente enjuagado en el Buffer CAPS. Sobre el gel se colocó una membrana de nitrocelulosa (membranas de Polivinilo: PVDF, Hybond) y sobre la membrana se colocaron 3 capas de papel filtro empapadas con el mismo buffer. Durante todo el proceso se evitó que quedaran burbujas de aire entre las hojas de papel, el gel y la membrana ya que estas dificultan la transferencia de las proteínas.

El sistema se cerró con la placa de grafito (ánodo) y la transferencia se realizó aplicando una corriente eléctrica constante de 1.5 mA/cm² durante 1 h.

Después se procedió al bloqueo de las proteínas; para ello, la membrana se incubó durante 1 h a TA en una solución de 5% de leche en polvo en PBS/0.05% Tween 20. Las membranas se guardaron a -20 °C hasta su uso (evitando que se secan) o se procedió de inmediato a su incubación con el anticuerpo primario (anticuerpo específico para la proteína en cuestión).

3.20 Generación de anticuerpos anti-EhCHS de *E. histolytica*

Los anticuerpos anti-quitina sintasa de *E. histolytica* se generaron contra péptidos de 15 aminoácidos de longitud de cada una de las secuencias de los genes EhCHS. Para ello se sintetizaron las secuencias H₂N- CRLRGVERDQSYADD – CONH₂ (aminoácidos 148 al 162) y H₂N – KRIFDKYSEPPQSGC – CONH₂ (aminoácidos 291 al 304) de la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. La síntesis y generación de anticuerpos contra dichos péptidos fueron hechas por la empresa EUROGENTEC BEL S.A. (Seraing, Bélgica). Para cada uno de los péptidos mencionados, dos conejos fueron inmunizados bajo un esquema de inmunización que comprendió 3 inyecciones con intervalos de 30 días y la toma de muestras (suero), 10 días después de cada inmunización.

La especificidad de los anticuerpos tomados después de cada inmunización se analizó por ensayos de *immuno-blot* retando los anticuerpos contra las proteínas de extractos de *E. histolytica*, tanto de las proteínas solubles como de las proteínas de membrana extraídas con el detergente octil-glicosil.

3.21 Detección inmunológica de las proteínas

Para la incubación con el anticuerpo primario (anticuerpos anti-EhCHS), estos se prepararon haciendo una dilución con una solución al 2.5% de leche en polvo sin grasa en PBS; la incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C con agitación ligera.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces (10 min cada vez, a TA) con una solución de TBS/0.05% Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM de NaCl, 0.05% Tween 20) y se procedió a su incubación con el anticuerpo secundario; Como segundo anticuerpo se usó inmunoglobulinas de suero de cerdo anti-conejo conjugadas con peroxidasa de la marca comercial DAKO.

La incubación con el anticuerpo secundario (dilución 1:2000 en una solución al 3% de leche en polvo en TBS-0.05% Tween 20) se realizó durante 2 h a TA con agitación ligera; después, la membrana se lavó 3 veces con la solución de TBS/0.05% Tween 20 en las mismas condiciones que los lavados después de la incubación con el anticuerpo primario.

Para la detección se usó el sistema de inmunodetección –quimioluminiscencia ECL+Plus™ Western blotting detection Reagents (Amersham Pharmacia Biotech).

El Sistema ECL+ Plus está basado en la generación enzimática de un éster de acridina, el cual produce una emisión de luz intensa y de larga duración. La oxidación combinada del sustrato de acridina, Lumigen PS-3, catalizada por HRP y peroxidasa, genera miles de intermediarios de éster de acridina por minuto los cuales reaccionan con la peroxidasa bajo condiciones ligeramente alcalinas para producir una quimioluminiscencia con una emisión máxima a una longitud de onda de 430 nm.

Para el proceso de detección se siguieron las instrucciones del fabricante; brevemente: Se preparó una cantidad suficiente de la mezcla de soluciones de detección A y B (0.1 ml/cm² de membrana) en proporción 40:1; se eliminó el exceso de buffer de lavado de la membrana por escurrimiento o colocando ligeramente un extremo de la membrana sobre papel absorbente, evitando que la membrana se secase completamente; la membrana se colocó con las proteínas hacia arriba, sobre una hoja de nylon e inmediatamente sobre la membrana se agregó la mezcla de soluciones A-B con ayuda de una pipeta; se incubó durante 2 min a TA. Se eliminó el exceso de solución de detección por drenado y colocando el extremo de la membrana sobre papel absorbente. Después la membrana se colocó entre dos hojas de papel Saran Wrap™ evitando que quedaran burbujas sobre la membrana. La membrana se colocó con las proteínas hacia arriba sobre un chasis para exposición autoradiográfica. Para la exposición, se usó una película Kodak (KODAK X-OMAT) o una película Hyperfilm™ECL (Amersham Pharmacia

Biotech) y los tiempos de exposición fueron entre 1 s y 2 min dependiendo de la intensidad de la señal obtenida.

3.23 Tinción de las proteínas con plata

Para la tinción de los geles SDS-PAGE se siguió el protocolo descrito por Heukeshoven y Dernick (1986): El gel se incubó en solución de fijación (solución 1) durante 10 min y después se incubó por 10 min en la solución 2 (solución de concentración). Enseguida se lavó 3 veces durante 10 min, cada vez, con agua bidestilada. Para la tinción el gel se incubó por 10 min en la solución 3 (solución de tinción) y posteriormente se incubó en la solución 4 (solución reveladora) hasta que las bandas de las proteínas se hicieron visibles a la intensidad deseada; cuando esto ocurrió, la reacción se paró adicionando aprox. 10 ml de solución 5 (solución para parar la reacción). Todo el proceso se realizó a TA (excepto cuando la tinción se concluyó al día siguiente, el gel se incubó a 4 °C en solución 2, durante toda la noche), usando aprox. 20 ml de cada solución por gel; las incubaciones se realizaron con agitación ligera.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4 RESULTADOS

4.1 Análisis de secuencias de quitina sintasas reportadas en bancos de datos.

Identificación de secuencias consenso

Con ayuda de los programas Clustal W (EMBL) y BLAST (NCBI) se hizo el análisis de las secuencias de los genes que codifican para quitina sintasas reportadas en los bancos de datos. Se identificaron 5 regiones conservadas al nivel de aminoácidos, mostradas en la tabla 9, y sobre estas regiones se diseñaron 8 oligonucleótidos degenerados en orientación *sense* y *antisense* (tabla 10).

Tabla 9. Regiones conservadas identificadas en la secuencia de aminoácidos de las quitina sintasas reportadas en los bancos de datos.

	** 755	799	836	872	1053
<i>D. melanogaster</i>	GAACG	PGCFS	EDRWLC	QRRRW	DVSWG T
<i>A. aegypti</i>	GAACG	PGCFS	EDRWLC	QRRRW	DVSWG T
<i>C. elegans</i>	GCACG	PGCFS	EDRWLS	QRRRW	VITWGT
<i>A. fumigatus</i> C	GGACG	PGAFS	EDRILC	QRRRW	DVSWG T
<i>C. albicans</i> I	Pos (769)	PGALS	EDRILC	QRRRW	DVSWG T
<i>N. crassa</i> 1	GGACG	PGAFS	EDRILC	QRRRW	DVSWG T
<i>P. chrysogenum</i> 4	GGACG	PGAFS	EDRILC	QRRRW	DVSWG T
<i>E. nidulans</i> D	MGLCG	PGCFS	EDRYLS	QRRRW	DFSWG D
<i>S. cerevisiae</i> 1	GGACG	PGAFS	EDRILC	QRRRW	DLSWG T
<i>M. grisea</i> 4	MGLCG	PGCFC	EDRYLT	QRRRW	DFSWG .
Secuencia considerada como consenso	GxACG	PGxFS	EDRxLx	QRRRW	DxSWG T

* Solo se incluyen las quitinas sintasas reportadas de algunas especies, tomando en cuenta aquellas de especies diferentes. *Drosophila melanogaster*, número de acceso: (CG7464); *Aedes aegypti*, número de acceso: AF223577; *Caenorhabditis elegans*, número de acceso: AF026210; *Aspergillus fumigatus*, número de acceso: U39479; *Candida albicans*, número de acceso: D43627; *Neurospora crassa*, número de acceso: M73437; *Penicillium chrysogenum*, número de acceso: AF173559; *Emmericella nidulans*, número de acceso: JC6079; *Saccharomyces cerevisiae*, número de acceso: M14045; *Magnaporthe grisea*, número de acceso: AF020528

** Los números indican la posición de Aa inicial del dominio identificado en la secuencia del gen CHS de *D. melanogaster*, fueron tomados como referencia para la identificación de los productos amplificados por PCR.

Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las secuencias conservadas de los genes CHS.

<i>Primer *</i>	<i>Sec. consenso **</i>	<i>Posición ***</i>	<i>Sec. de nucleótidos ****</i>
P1 (s16)	GxACG	755	TWGGAGSWGCGWTGTGG
P2 (s14)	PGxFS	799	CCAGGAKSTTTYWS
P3 (s17)	EDRxLx	836	GAAGATAGAWKKYTWWS
P4 (as17)	EDRxLx	836	SWWARMMWTCTATCTTC
P5 (s15)	QRRRW	872	CAAAGAAGAAGATGG
P6 (as15)	QRRRW	872	CCATCTTCTTCTTTG
P7 (s17)	DxSWGt	1053	GATNTTWSWTGGGGAAC
P8 (as17)	DxSWGt	1053	GTTCCCAWSWAANATC

* Entre paréntesis se indica la orientación (s=*sense*; as=*antisense*) así como el número de nucleótidos de cada primer.

** Secuencia de Aa considerada consenso en las regiones conservadas sobre las cuales se diseñaron los primers.

*** La posición está indicada tomando como referencia la posición de los Aa en la secuencia del gen de la quitina sintasa de *D. melanogaster*.

**** En la secuencia de los primers, W, S, K, Y, N, R y M representan la presencia de los nucleótidos siguientes: W = A/T; S = G/C; K = G/T; M = A/C; Y = T/C; R = A/G; N = G/A/T ó C.

4.2 Ensayos de PCR sobre DNA genómico de *E. histolytica*

Con los oligonucleótidos diseñados sobre las regiones consenso de quitina sintasas se hicieron ensayos de PCR usando como templado el DNA genómico de *E. histolytica*. Se probaron todas las combinaciones posibles de los oligonucleótidos con un gradiente (35 a 45 °C) de temperatura de alineamiento.

Como resultado de las reacciones de PCR sobre el DNA genómico de *E. histolytica*, con las combinaciones de oligonucleótidos P1: (T(AT)GGAG(CG)(AT)GC(AT)TGT GG y P6: (CCATCTTCTTCTTTG que corresponden en parte a la regiones aminoacídicas GxACG y QRRRW, respectivamente, se obtuvieron varios fragmentos, uno de los cuales presentó un tamaño (365 pb) correspondiente al esperado en la reacción (ver Fig. 1). Dicho fragmento se aisló para su posterior clonación y secuenciación. Con los oligonucleótidos P5: (cuya secuencia es complementaria a P6: CAAAGAAGAAGATGG) y P8: (GTTCCCA(AT)(CG)(AT)AA(GATC)ATC, cuya secuencia corresponde a los aminoácidos DxSWGt se obtuvo como producto único un fragmento de 543 pb. Con el resto de las combinaciones de oligonucleótidos no se obtuvieron productos de amplificación por PCR.

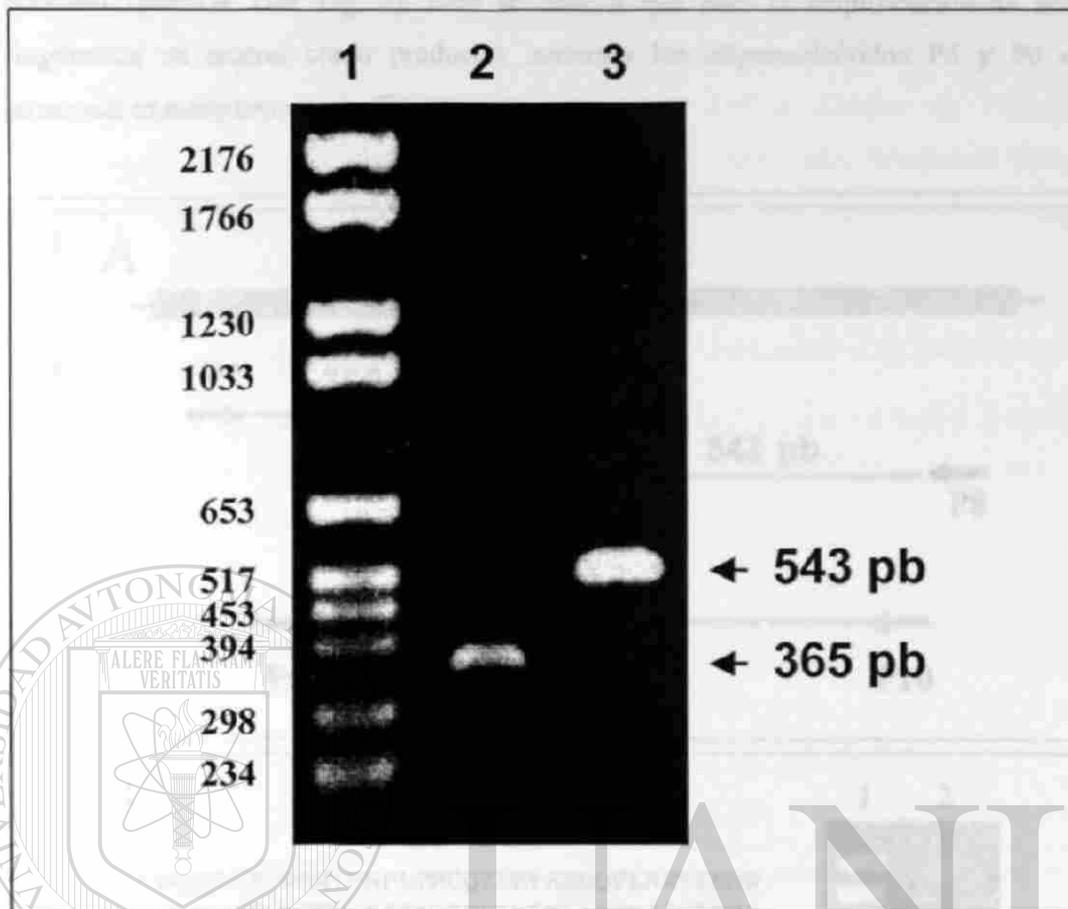


Fig. 1. Productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos degenerados P1-P6 y P5-P8 sobre el DNA genómico de *E. histolytica*. Como producto de la amplificación con P1 y P6 (Carril 2) se obtuvieron, además de la banda que aquí se muestra ya pura (365 pb), otros productos inespecíficos de la reacción. Mientras que, como resultado de la amplificación con los *primers* P5-P8 se obtuvo un fragmento único de 543 pb (Carril 3). La selección de los productos se hizo tomando en cuenta el tamaño de las bandas, calculado con base en la posición de los *primers* sobre la secuencia del gen de *D. melanogaster*. En el carril 1 se encuentra el marcador de talla molecular VI (Boheringer).

Los fragmentos de DNA (365 y 543 pb) se clonaron en el vector PCR^R 2.1 (Invitrogen) y posteriormente se hizo la transformación en la cepa DH5 α de *E. coli*. De esta manera se aseguró el abastecimiento de DNA correspondiente a los fragmentos amplificados por PCR para su posterior secuenciación y uso como sonda.

El análisis de las secuencias de ambos productos de PCR muestra que las secuencias de DNA amplificadas por estos dos pares de iniciadores son contiguas en el DNA genómico de *E. histolytica*, es decir, hay una continuidad en la secuencia de nucleótidos correspondientes al extremo 3' del fragmento de 365 pb y el extremo 5' del fragmento de 543 pb; con una región de traslape correspondiente a la secuencia que codifica para el

dominio QRRRW (ver Fig. 2). Esto se debe a que para la amplificación de sendos fragmentos se usaron como productos comunes los oligonucleótidos P5 y P6 cuya secuencia es complementaria (Fig. 2).

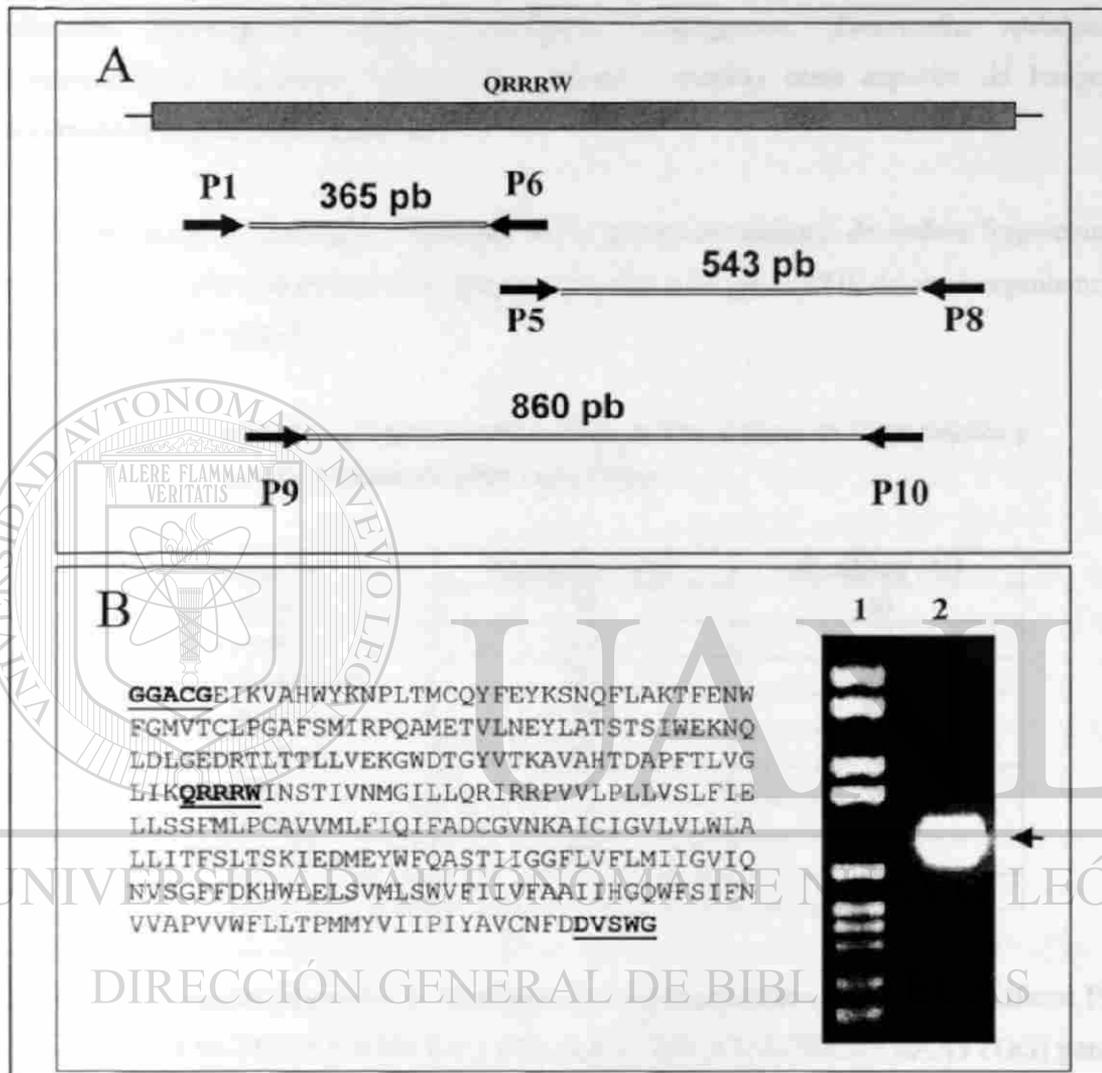


Fig 2. Representación esquemática de los resultados y estrategia seguidos en la primera etapa del trabajo. (A) Amplificación por medio de PCR y oligonucleótidos degenerados de fragmentos de DNA correspondientes a un presunto gen de la quitina sintasa de *E. histolytica*. Se indica la presencia del dominio QRRRW, secuencia señal característica de todos los genes CHS descritos hasta el momento y sobre la cual fueron diseñados los *primers* P5 y P6. (B) Secuencia de Aa deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida de los fragmentos de 365 y 543 pb. Los dominios sobre los cuales fueron diseñados los *primers* degenerados están subrayados. En la imagen de la derecha se observa el marcador de talla molecular VI (carril 1) y la imagen del amplicón (carril 2, cabeza de flecha) obtenido con los *primers* específicos (P9 y P10) diseñados sobre la secuencia de los fragmentos citados.

Además, el análisis de comparación de las secuencias de dichos fragmentos demostró que la secuencia aminoacídica de ambos fragmentos tiene una homología relativamente alta (43 a 53%) con las secuencias de los genes de quitina sintasas de *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Caenorabditis elegans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Emericella nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Magnaporthe grisea* y muchas otras especies de hongos reportadas en los bancos de datos.

Los porcentajes de identidad y similitud de la secuencia conjunta de ambos fragmentos (aproximadamente 900 pb) de dicho gen con respecto a los genes CHS de otros organismos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Comparación de secuencias entre quitina sintasa de *E. histolytica* y quitina sintasas de otros organismos.

Espece	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>C. elegans</i>	30	46
<i>A. aegypti</i>	28	46
<i>D. melanogaster</i>	28	44
<i>A. quisqualis</i>	28	42
<i>A. nidulans</i>	28	43
<i>A. fumigatus</i>	34	53
<i>U. maydis</i>	35	54
<i>S. cerevisiae</i>	27	42
....

Sobre las secuencias obtenidas se diseñaron los oligonucleótidos internos específicos P9 (GAAAATTAAAGTTGCGCAATTGG) y P10 (AAAATTACATACTGCATAAAATTGG) para, por medio de PCR, amplificar un fragmento de un tamaño ligeramente menor (860 pb) a la secuencia ya conocida del presunto gen de la quitina sintasa de *E. histolytica*. Como resultado de la amplificación con los oligonucleótidos P9 y P10 se obtuvo un producto único de un tamaño correspondiente al esperado (ver Fig. 2) cuya secuencia es idéntica a la secuencia conjunta de los fragmentos de 365 y 543 pb; comprobando que dicha continuidad no es producto de una quimera y que se trata de secuencias correspondientes al mismo gen representado en el genoma de *E. histolytica*.

4.3 Tamizaje de la biblioteca de DNA de *E. histolytica* y secuenciación del gen EhCHS1

Una vez corroborada la identidad de la secuencia de los fragmentos amplificados por PCR con los oligonucleótidos diseñados sobre las regiones conservadas de quitina sintasas, el siguiente paso fue tamizar una biblioteca de DNA de *E. histolytica* construida en el bacteriófago λ ZAP.

El primer tamizaje se realizó usando como sonda el fragmento de 543 pares de bases marcado con ^{32}P . No se usó el fragmento de 900 pares de bases debido a que los experimentos se hicieron en paralelo y aún no se contaba con la secuencia de dicho fragmento. Con este tamizaje se obtuvieron 3 clonas con señal positiva. Después de la escisión *in vivo* del vector correspondiente a cada clona, estos se propagaron en la cepa XL0LR de *E. coli* para su análisis por medio de minipreparaciones de DNA y digestión con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pst* I, para liberar el fragmento clonado. Los fragmentos liberados de las 3 clonas son del mismo tamaño, aproximadamente 4 Kb, lo cual sugiere que se trata del mismo fragmento (ver Fig. 3, recuadro A). Para comprobar lo anterior, se determinó la secuencia parcial (en ambos extremos) de las 3 clonas. El resultado de la secuenciación mostró que las clonas tienen el mismo inserto de DNA de *E. histolytica* y que la secuencia de estos corresponde, por homología, a la secuencia del gen de una quitina sintasa (datos no mostrados). Se decidió realizar la secuenciación de solo una de las clonas seleccionadas (clona ZAP 5.2). La determinación de la secuencia completa del inserto se realizó por medio de la generación de subclonas y el diseño de oligonucleótidos específicos.

Cuando se hizo la secuenciación de la clona ZAP 5.2 no se encontró el codón de inicio del gen. Dado que, para la construcción de la biblioteca en λ ZAP, el DNA de *E. histolytica* fue digerido con la enzima *Sau* 3A, se procedió a la búsqueda de un sitio de restricción para esta enzima en la secuencia de los fragmentos conocidos (365 y 543 pb). Se encontró un sitio de corte para dicha enzima a aproximadamente 150 pb hacia el extremo 3' del fragmento de 365 pb. Este resultado indica que la secuencia del gen no está completa en una sola clona y explica por qué no se encontró el codón de inicio en la clona de λ ZAP analizada.

4.3.1 Tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de *E. histolytica* en λ ZAP usando como sonda el fragmento de 200 pb

El siguiente paso fue hacer otro tamizaje de la biblioteca pero ahora usando como sonda el fragmento de 200 pb correspondiente a la región 5' del producto de 860 pb resultado de la amplificación con los oligonucleótidos internos específicos P9 y P10, clonado previamente en el vector PCR 2.1. Esta sonda se obtuvo digiriendo el DNA del vector que contenía el inserto, con las enzimas *Eco* RI y *Sau* 3A. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa y a partir de este se aisló la banda de 200 pb.

En el tamizaje de la biblioteca con la sonda de 200 pb se identificaron y aislaron 4 clonas con señal positiva que se analizaron de la misma manera que las clonas obtenidas en el primer tamizaje. El resultado de la digestión mostró que todas las clonas tenían un inserto del mismo tamaño (aproximadamente 4.2 Kb) que se liberó en forma de dos bandas, una de 3 Kb y otra de 1.2 Kb, producto de la presencia de un sitio de restricción *Hind* III interno en la secuencia (Fig. 3, recuadro B). Se tomó la decisión de determinar la secuencia de solo una de las clonas (Clona ZAP 1.1).

En la secuencia de nucleótidos de la región 3' de esta clona se identificó el codón de inicio del gen de la presunta quitina sintasa de *E. histolytica*.

El supuesto gen que codifica para una quitina sintasa de *E. histolytica* (EhCHS1) tiene un ORF que consta de aproximadamente 1900 pb y el análisis virtual indica que dicho gen codifica para una proteína de un peso molecular aproximado de 70 kDa. (Fig. 3).

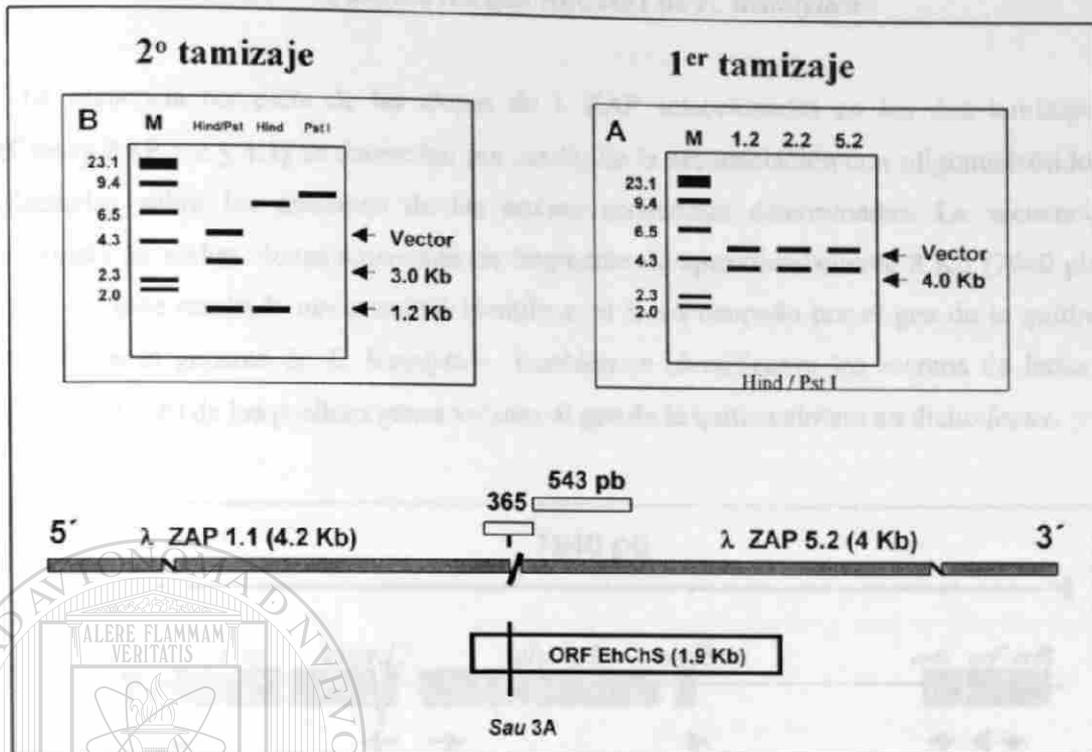


Fig. 3. Estrategia del tamizaje de la biblioteca de DNA genómico de *E. histolytica* construida en el vector λ ZAP. Se representan de manera esquemática los resultados obtenidos en los tamizajes realizados: en el primer tamizaje usando como sonda el fragmento de 543 pb se aislaron 3 clonas cuyo análisis reveló que éstas contenían el mismo inserto de DNA de *E. Histolytica* (recuadro A). Cuando se determinó la secuencia de nucleótidos de una de ellas no se encontró el codón de inicio del ORF de la supuesta proteína (quitina sintasa) para la cual codifica esta secuencia. El análisis de las secuencias obtenidas en los fragmentos de 543 y 365 pb reveló la presencia de un sitio de restricción para la enzima *Sau* 3A con la cual se había digerido el DNA para la construcción de la biblioteca. Se procedió a un segundo tamizaje de la biblioteca usando como sonda un fragmento de 200 pb correspondiente a la región 5' del fragmento de 365 pb. El fragmento de 200 pb es adyacente al sitio *Sau* 3A y su secuencia es continua con el ORF encontrado en la clona de λ secuenciada. Con este segundo tamizaje también se aislaron 3 clonas positivas y después del análisis de restricción se determinó que las 3 contenían el mismo inserto de DNA (recuadro B); se determinó la secuencia de solo una de ellas. En la figura se esquematiza la posición del ORF del gen EhChS1 que presuntamente codifica para una quitina sintasa de *E. histolytica*.

4.4 Posición del gen EhCHS1 de *E. histolytica*

La secuencia completa de las clonas de λ ZAP seleccionadas en los dos tamizajes (Clonas ZAP 5.2 y 1.1) se determinó por medio de la secuenciación con oligonucleótidos diseñados sobre los extremos de las nuevas secuencias determinadas. La secuencia completa de ambas clonas representa un fragmento de aproximadamente 8 Kb (7940 pb) (Fig. 4). Este resultado nos permitió identificar el *locus* ocupado por el gen de la quitina sintasa en el genoma de *E. histolytica*. También se identificaron los marcos de lectura abiertos (ORF) de los posibles genes vecinos al gen de la quitina sintasa en dicho *locus*.

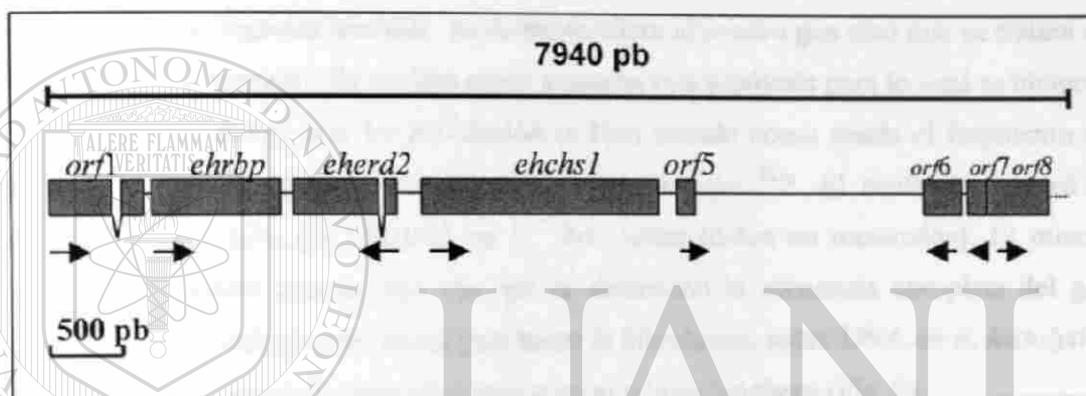


Fig. 4. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS1) en el fragmento de 8 Kb secuenciado correspondiente a las clonas 5.2 y 1.1 del bacteriófago λ ZAP. Las regiones codificantes están representadas por cuadros grises y la orientación de los marcos de lectura abiertos (ORFs) está indicada por flechas. Los espacios conectados indican la posición de intrones. La asignación de los genes fue hecha con base en la homología de la secuencia deducida del DNA a la secuencia de proteínas conocidas en las bases de datos. orf 1, ORF de 600 pb; rbp, Proteína B de unión a RNA; erd2, receptor KDEL/HDEL; chs1, quitina sintasa; orf 5, ORF de 194 pb; orf 6, ORF de 371 pb; orf 7, ORF de 194 pb; orf 8, ORF de más de 472 pb. Los ORF numerados no tienen homología significativa con respecto a secuencias de proteínas reportadas en las bases de datos.

En posición “río arriba” y contiguo al gen de la quitina sintasa, se encuentra el gen ERD2 el cual codifica para una proteína integral de membrana presente en la cara *cis* del complejo de Golgi y que fue reportado previamente por Sánchez-López y col. (1998). Siguiendo hacia el extremo 5' de la secuencia, se identificaron dos ORFs de 995 y 700 pb; los cuales de acuerdo con el análisis de comparación de secuencias (con ayuda del programa BLAST) se presume que codifican para proteínas de unión a RNA nuclear. En posición “río abajo” también se identificaron 4 posibles ORFs, ninguno de los cuales presenta homología significativa con respecto a otras secuencias reportadas en los bancos de datos.

4.5 Ensayos tipo Southern blot

Debido a que los reportes de los genes de quitina sintasa en otras especies indican la presencia de varias isoformas del gen (genes multicopia), y a que *E. histolytica* requiere los 3 cofactores de las quitinas sintasas (Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+}) para formar estructuras resistentes a SDS (Campos-Góngora *et al.*, 2000) cuyas paredes contienen una mayor cantidad de un polisacárido rico en GlcNAc, presumiblemente quitina, (Said-Fernández *et al.*, 2001), pensamos que en *E. histolytica* no era difícil encontrar más de un gen que codificara para quitina sintasa y, por otra parte, en la posibilidad de que la secuencia encontrada en el segundo tamizaje, no correspondiera al mismo gen sino que se tratara de una "secuencia quimera". Se decidió poner a prueba esta hipótesis para lo cual se hicieron ensayos tipo Southern blot. La hibridación se hizo usando como sonda el fragmento de 860 pb del gen EhCHS1 de *E. histolytica* marcado con ^{32}P . El resultado mostró la presencia de un solo gen EhCHS1 en *E. histolytica* (datos no mostrados). El mismo resultado se obtuvo cuando, una vez que se determinó la secuencia completa del gen (1.9 Kb), esta se utilizó como sonda para hacer la hibridación sobre DNA de *E. histolytica* digerido con enzimas diferentes a las usadas en el primer Southern (Fig. 5).

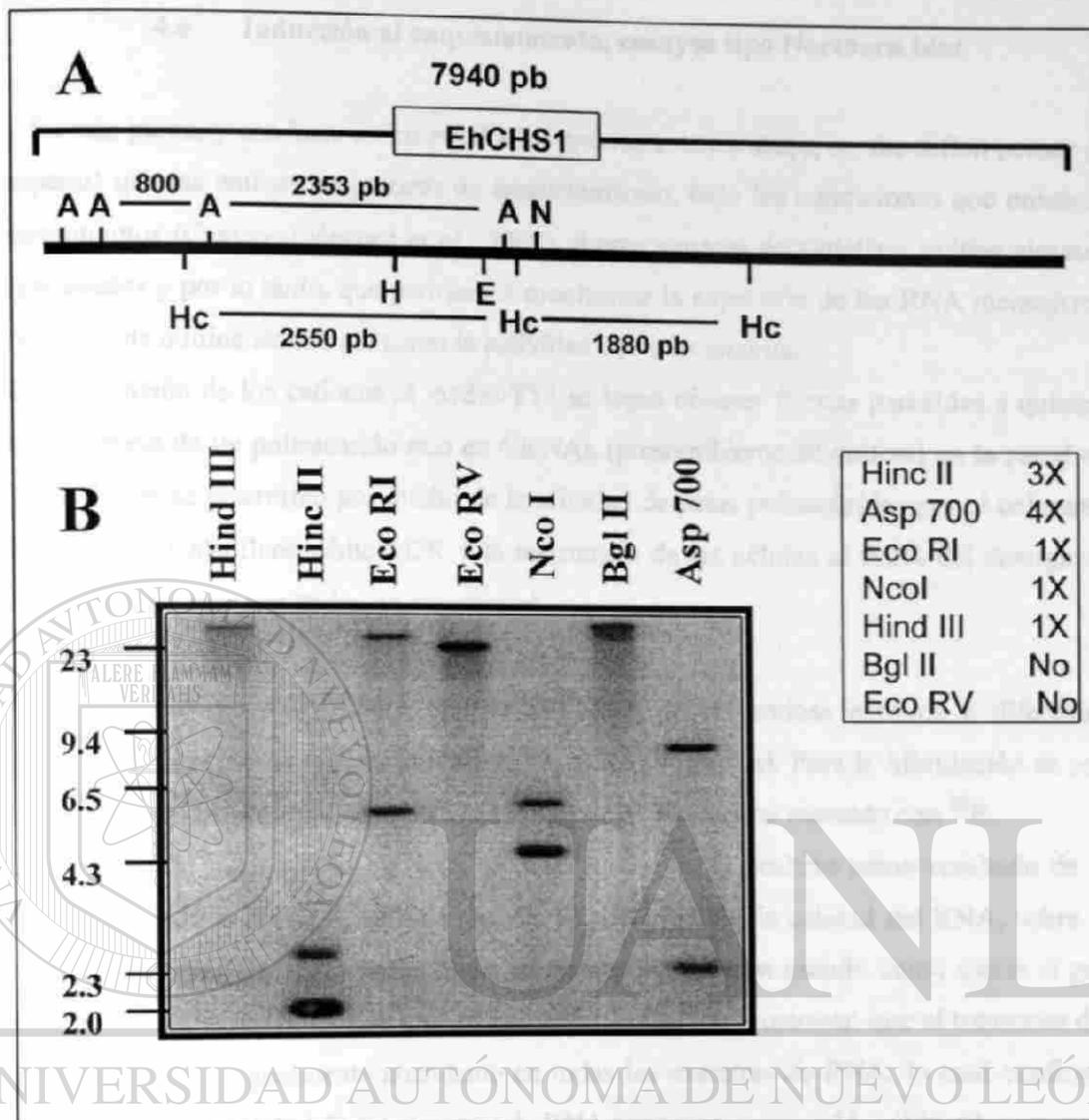


Fig. 5. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS1 de *E. histolytica* y de la región ocupada por éste.
A) Representación esquemática de la secuencia total de DNA determinada en las clonas 5.2 y 1.1 del bacteriófago λ ; se indican los sitios de corte predichos en la secuencia (con ayuda del Programa DNASIS); también se indica el tamaño de los fragmentos esperados en la digestión con cada una de las enzimas.
B) El DNA genómico de *E. histolytica* (80 μ g/linea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción Hinc II, Asp 700, Eco RI, Nco I, Hind III, Bgl II y Eco RV. Después de la separación de las muestras por medio de electroforesis, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó el fragmento de DNA que corresponde al gen completo (1.9 Kb) de la quitina sintasa de *E. histolytica* marcado con 32 P. En el lado izquierdo de la imagen se indica (en Kb) el tamaño de los marcadores de talla molecular. En el cuadro de la derecha se indica el número (X) de sitios de corte para cada una de las enzimas.
 Hc=Hinc II, A=Asp 700, E=Eco RI, N=Nco I y H=Hind III.

4.6 Inducción al enquistamiento, ensayos tipo Northern blot

En este punto, y con base en los resultados previos a este trabajo, no fue difícil pensar (y esperar) que las amibas en proceso de enquistamiento, bajo las condiciones que nosotros encontramos (Campos-Góngora *et al.*, 2000), fueran capaces de sintetizar quitina sintasas funcionales y por lo tanto, que podríamos monitorear la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) de quitina sintasa así como la actividad de dicha enzima.

Con la adición de los cationes al medio TYI se logró obtener formas parecidas a quistes. La presencia de un polisacárido rico en GlcNAc (presumiblemente quitina) en la pared de estas células se determinó por medio de la afinidad de estos polisacáridos por el colorante fluorescente Calcofluor white M2R y la resistencia de las células al 0.2% del detergente N-lauril sarcosina (resultados no mostrados).

Para los ensayos tipo Northern blot se usó RNA de las amibas extraído a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento (0, 3, 6, 12, 24 y 48 h). Para la hibridación se usó como sonda el gen completo EhCHS1 (1.9 Kb) de *E. histolytica* marcado con ³²P.

En ninguna de las muestras de RNA se observó una señal positiva como resultado de la hibridación con la sonda de quitina sintasa. Para comprobar la calidad del RNA, sobre la misma membrana que contiene el DNA se hizo la hibridación usando como sonda el gen de actina de *E. histolytica*. Los resultados de la hibridación mostraron que el transcrito del gen de actina fue igualmente abundante en todas las muestras de RNA, lo cual confirmó que la calidad y cantidad de las muestras de RNA total eran comparables (Fig. 6).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

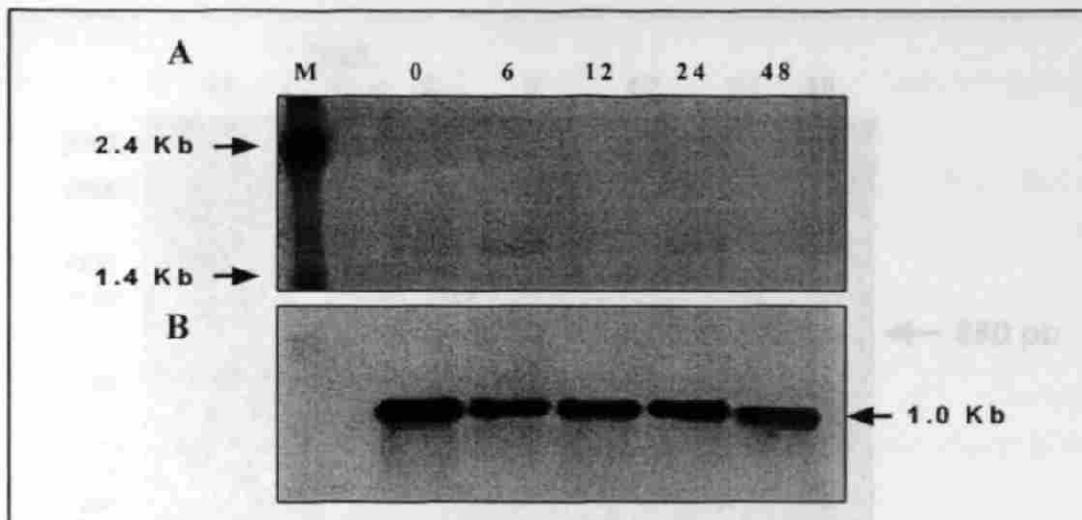


Fig. 6. Análisis tipo Northern blot del gen EhCHS1 de *E. histolytica*. Después de la transferencia del RNA a las membranas de nitrocelulosa, se hizo la hibridación usando como sonda el fragmento de 860 pb del gen EhCHS1 marcado con 32 P (A). Para comprobar la calidad del RNA, sobre la misma membrana se hizo una hibridación usando como sonda el gen de actina de *E. histolytica* (B). A la izquierda de la figura está indicada la posición de los marcadores de talla molecular (M); a la derecha se indica la posición de los RNAm de actina. Los números (0-48) indican el tiempo en horas al cual se hicieron las extracciones de RNA, después de la inducción al enquistamiento por medio de la adición de cationes al medio de cultivo.

4.7 Ensayos de transcripción reversa

La ausencia de señal positiva en los ensayos tipo Northern blot puede deberse a la presencia de cantidades muy pequeñas de mRNA de la enzima que no son detectadas por hibridación con la sonda radiactiva. Para comprobar esta hipótesis se hicieron ensayos de RT-PCR sobre el RNA de amibas obtenido a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento.

Para asegurar que el RNA no estuviera contaminado con DNA, éste se trató primero con DNasa. A partir del RNA se obtuvo el cDNA y sobre éste se hicieron ensayos de PCR usando para ello oligonucleótidos específicos para CHS de *E. histolytica*. Los ensayos de PCR se hicieron usando 15, 20 y 25 ciclos en la reacción.

A los 15 y 20 ciclos de la reacción no hay una señal positiva visible que nos indique amplificación sobre el cDNA, pero a los 25 ciclos hay una señal visible que nos muestra un fragmento del tamaño esperado (Fig. 7).

Este resultado también nos muestra que no hay una diferencia en la cantidad del producto amplificado a partir de los cDNAs obtenidos del RNA de *E. histolytica* a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento.

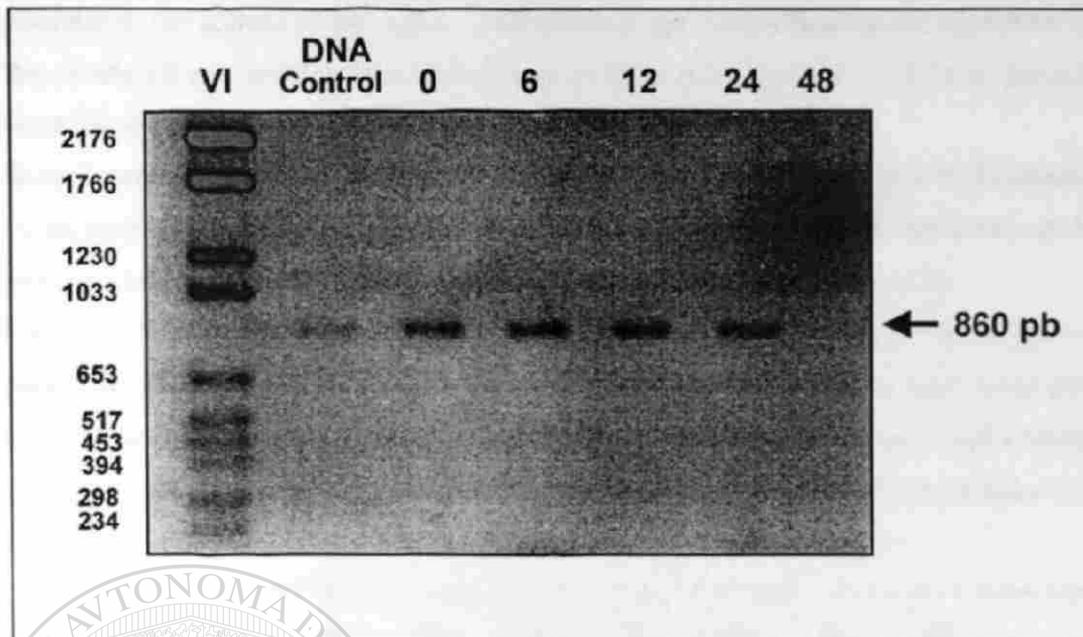


Fig. 7. Análisis de RT-PCR sobre el RNA total de *E. histolytica*. A partir del RNA total de ambas obtenido a diferentes tiempos del proceso de enquistamiento y por medio de transcripción reversa se obtuvo el cDNA; sobre éste se hicieron ensayos de PCR usando los *primers* P9 y P10, específicos para el gen EhCHS1 de *E. histolytica*. Los ensayos de PCR se hicieron usando 15, 20 y 25 ciclos en la reacción. Los productos resultantes se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para su posterior tinción y análisis. La figura corresponde al resultado de la amplificación a los 25 ciclos de PCR; los productos que se observan en las diferentes muestras presentan el tamaño esperado (860 pb) con base en los *primers* que se usaron para la amplificación. Nótese también que no hay una diferencia en la cantidad del producto amplificado a partir del cDNA proveniente de las muestras de RNA obtenido a diferentes tiempos del proceso de inducción al enquistamiento en medio TYI adicionado con cationes.

Los números en la parte superior de la figura representan el tiempo (en horas) al cual se hizo la extracción de RNA, después de que se indujo a la diferenciación (para una descripción más detallada ver material y métodos). La muestra de RNA obtenida a las 48 h estaba contaminada con un material parecido a polisacáridos. A la izquierda de la figura se indica la posición (en pares de bases) de los marcadores de talla molecular y en el primer carril se observa DNA amplificado que sirvió como control de la reacción de PCR.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.8 Expresión de la Proteína EhChS1 de *E. histolytica* en un sistema bacteriano

Para expresar la proteína correspondiente, el gen EhCHS1 se clonó en los vectores de expresión pJC45 y pHisT7. Previo a la clonación del gen EhCHS1 en los vectores se comprobó por medio de secuenciación que no había errores en el marco de lectura de los insertos. Los análisis de expresión se hicieron en 5 clonas positivas (pJC45/EhCHS) y en 4 clonas positivas pHisT7/EhCHS).

Como cepa hospedadora para el vector pJC45 se usó la cepa pAPLac y para el vector pHisT7, las cepas BL21-DE3 y BL21-DE3 pLYS de *E. coli*. La inducción de la expresión en ambos sistemas se hizo por medio de la adición de IPTG. Después de la inducción, se

obtuvieron los extractos del cultivo bacteriano y por centrifugación se separaron las fracciones del precipitado y sobrenadante; el análisis de las proteínas se hizo en geles de poliacrilamida-SDS.

Se realizaron 3 ensayos modificando las condiciones experimentales (tiempo de incubación de los cultivos, concentración final de IPTG: 0.5 mM y 1 mM, método de extracción de las proteínas totales) y en ninguno de ellos se obtuvieron los resultados esperados.

En la Fig. 8 se presenta la imagen de un gel de poliacrilamida-SDS en uno de los intentos para determinar la presencia de la proteína EhChS recombinante; en esta serie de ensayos no se pudo observar la banda correspondiente a la proteína esperada cuyo tamaño teórico (73 kDa), calculado en base a la secuencia de Aa, se indica con la flecha a la derecha de la figura.

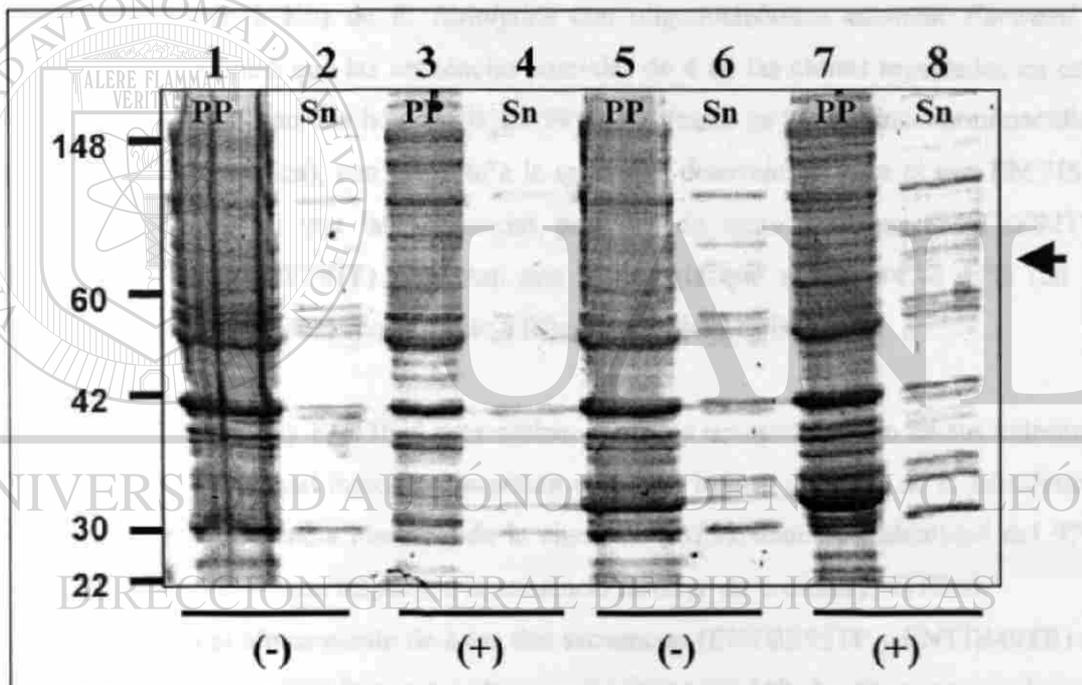


Fig. 8. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes en el sistema bacteriano.

La imagen representa uno de los análisis en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas obtenidas a partir de los extractos de *E. coli* cepa BL21DE3pLYS transformadas con el plásmido pHisT7 que acarrea el gen EhCHS1. El análisis se hizo tanto en las proteínas sedimentables a 12,000 x g (PP) como en el sobrenadante (Sn) de esta fracción. A la izquierda de la imagen se indica la posición de los marcadores de peso molecular. Carriles 1 al 4: extractos de la clona control (BL21DE3pLYS sin inserto); carriles 5 al 8: clona BL21DE3pLYS que acarrea el inserto EhCHS1. El signo (+) representa el cultivo adicionado con IPTG, el signo (-), cultivos sin IPTG. La flecha representa la posición esperada de la proteína recombinante (73 kDa), calculada con base en el tamaño predicho de acuerdo a la secuencia de la proteína. El gel fue teñido con azul de Coomassie y posteriormente digitalizado para su presentación.

Se comprobó, por medio de secuenciación directa sobre los vectores pJC45/EhCHS y pHisT7/EhCHS, que los fragmentos clonados tienen la orientación correcta y que se conserva el marco de lectura en las clonas analizadas.

4.9 Tamizaje virtual en TIGR-Bank para buscar otro posible gen EhCHS

Usando como sonda la secuencia del gen Eh-ChS de 1.9 Kb, se realizó un "Tamizaje virtual" sobre las secuencias de DNA de *E. histolytica* reportadas en el banco de datos de TIGR (The Institute for Genomic Research: www.tigr.org/tdb/edb2/enta/htmls/). En este proyecto hacen la secuenciación parcial automatizada de clonas de DNA genómico (de un tamaño aprox. de 2 Kb) de *E. histolytica* con oligonucleótidos estándar *Forward* y *Reverse*). Se encontró que las secuencias parciales de 4 de las clonas reportadas en esta base de datos presentan una homología del 94 y 99% (tanto en la secuencia aminoacídica como en la nucleotídica), con respecto a la secuencia determinada para el gen EhCHS1. También se encontró que las secuencias parciales de otras 3 clonas (ENTBZ92TF, ENTJB40TR y ENTJF28TF) presentan una homología que va del 44 al 47% (en la secuencia de aminoácidos) con respecto a la secuencia del gen EhCHS1.

Las clonas ENTBZ92 y ENTJF28 presentaban la misma secuencia, tanto en sus extremos 5' como en el 3', lo cual indica que acarrean el mismo inserto de DNA de *E. histolytica*. Mientras que la secuencia *Forward* de la clona ENTBZ92 tiene una identidad del 97% (251/259 nucleótidos) con respecto a la secuencia *Reverse* de la clona ENTJB40.

Cuando se hizo el alineamiento de estas dos secuencias (ENTBZ92TF y ENTJB40TR) se obtuvo, en conjunto, un fragmento de aproximadamente 448 Aa (con una región de traslape entre las clonas de aproximadamente 82 Aa). La comparación de esta secuencia con la secuencia del gen EhCHS1 muestra una homología del 42% en el extremo carboxi-terminal. En esta zona se identificaron las regiones consenso características de las diferentes CHS reportadas en los bancos de datos para otros organismos. La comparación de esta secuencia (CHS de TIGR) con las secuencias reportadas en los bancos de datos (con ayuda del programa BLAST), muestra una similitud del 45-50% con respecto a la secuencia de quitina sintasas de otros organismos entre los que podemos mencionar *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* y diversos hongos.

Con estos resultados, se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias ENTBZ92TF y ENTJB40TR y sus respectivos extremos complementarios (ENTBZ92TR y ENTJB40TF) para amplificar, por medio de PCR sobre DNA genómico de *E. histolytica*, la secuencia completa de este nuevo gen (EhCHS2) que posiblemente codifica para una quitina sintasa de *E. histolytica* diferente a la codificada por el gen EhCHS1.

La Fig. 9 muestra de manera esquemática la estrategia seguida para el tamizaje virtual del banco de datos TIGR.

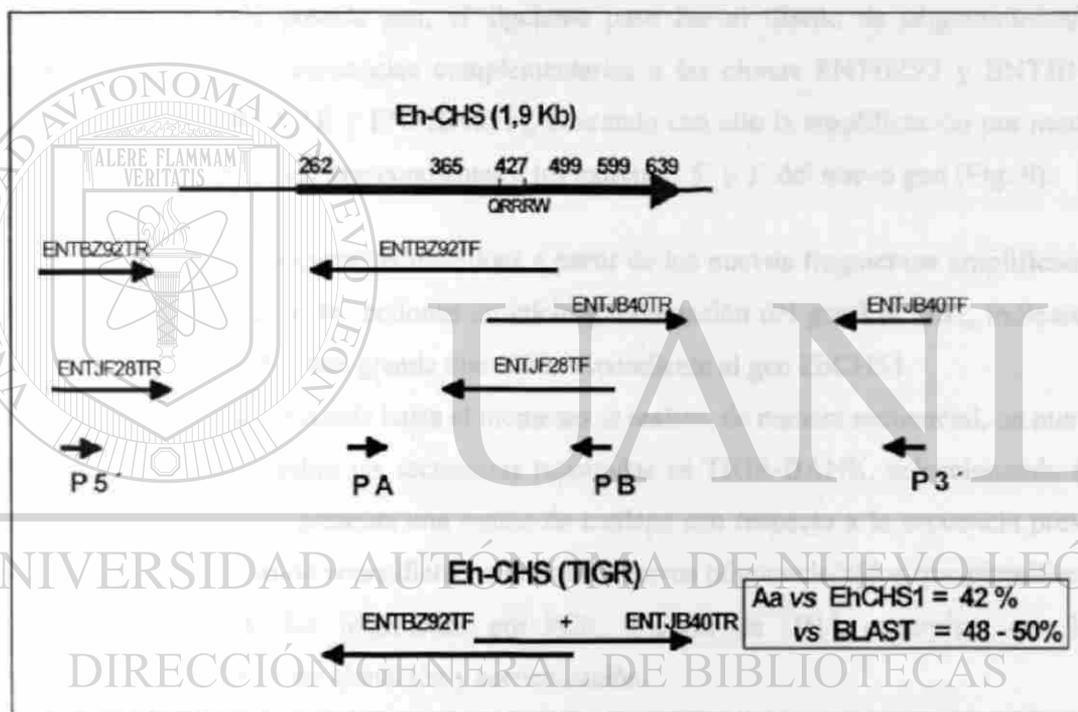


Fig. 9. Representación esquemática de la estrategia seguida para el tamizaje virtual del banco de datos TIGR-BANK usando como sonda la secuencia determinada en este trabajo correspondiente al gen EhCHS1 de *E. histolytica*. Se indican los nombres de las clonas cuya secuencia presenta una homología del 40-50 % con la secuencia EhCHS1, y que posiblemente corresponden a un nuevo gen EhCHS. También se indica la posición de los oligonucleótidos diseñados en esta primera etapa, para la amplificación de esta nueva secuencia sobre el DNA genómico de *E. histolytica*. En el cuadro se indica el porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos conjunta de las clonas ENTBZ92TF y ENTJB40TR con respecto al gen EhCHS1 y con respecto a CHS de otras especies reportadas en los bancos de datos.

Con los oligonucleótidos diseñados (PA y PB) fue posible la amplificación de un fragmento de DNA de 1107 pb. De los 369 Aa deducidos a partir de esta secuencia, 308 Aa presentan una identidad del 100% con respecto a los Aa deducidos a partir de la secuencia que corresponde a las clonas reportadas en TIGR-BANK.

El análisis de la secuencia de dicho fragmento con ayuda del programa BLAST, reveló una alta homología (48-50%) con respecto a secuencias correspondientes a quitina sintasas de especies diferentes a las encontradas en el análisis para el gen EhCHS1. Mientras que el alineamiento pareado con la secuencia correspondiente al gen EhCHS1 demuestra una homología del 42%.

La evidencia anterior indica que esta nueva secuencia corresponde a un nuevo gen EhCHS que posiblemente codifica para una quitina sintasa en este protozoario.

Debido a que en el análisis de la secuencia determinada (correspondiente al gen EhCHS2, con un ORF que consta de 369 Aa) no se observaron ni el codón de inicio ni el codón de terminación de este posible gen, el siguiente paso fue el diseño de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias complementarias a las clonas ENTBZ92 y ENTJB40 (secuencias: ENTBZ92TR y ENTJB40TF), buscando con ello la amplificación por medio de PCR de las regiones correspondientes a los extremos 5' y 3' del nuevo gen (Fig. 9).

En el análisis de las secuencias obtenidas a partir de los nuevos fragmentos amplificados tampoco se encontraron los codones de inicio y terminación del gen EhCHS2, indicando que se trata de un ORF más grande que el correspondiente al gen EhCHS1.

Con la secuencia determinada hasta el momento se realizó, de manera secuencial, un nuevo tamizaje electrónico sobre las secuencias reportadas en TIGR-BANK, seleccionando las clonas cuya secuencia presenta una región de traslape con respecto a la secuencia previa determinada y diseñando sobre dichas secuencias nuevos oligonucleótidos que permitieran la amplificación de los fragmentos por PCR, a partir de DNA genómico; con los subsecuentes procesos de clonación y secuenciación.

Con esta estrategia fue posible determinar la secuencia completa del gen EhCHS2 de *E. histolytica*, desde el codon de inicio hasta el codon de término. Dicha secuencia presenta un ORF de 2943 pb (correspondientes a 981 Aa), sin regiones no-codificantes (intrones) que interrumpan dicho ORF.

El gen EhCHS2 tiene un ORF mas grande que el gen EhCHS1, lo cual va más de acuerdo a los datos que se tienen de genes de quitina sintasa de otros organismos como nemátodos (*Brugia malayi*, *Caenorabditis elegans*), e insectos (*Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*) además de su mayor similitud con los genes que codifican para quitina sintasas de la clase III de hongos y levaduras.

Además, en el fragmento de 4700 pb cuya secuencia se determinó, se identificaron los ORF de los genes adyacentes al gen EhCHS2.

4.10 Posición del gen EhCHS2 de *E. histolytica*

En la Fig. 10 se puede observar la estructura del gen EhCHS2 así como la región que ocupa dicho gen en el genoma de *E. histolytica*, además de la presencia de los genes adyacentes. Hacia el extremo 5', contiguo al gen EhCHS2, se encuentra el ORF correspondiente al gen que codifica para la proteína ribosomal L39 (*Ehrp*) y adyacente a éste se encuentra el gen que codifica para la proteína calmodulina (*Ehcal*); la secuencia parcial de este gen fue reportada por Tanaka y col. en 1997 y posteriormente la secuencia completa del gen se determinó en este laboratorio (datos no publicados). Por otra parte, en el extremo 3' de la secuencia se encuentra el gen *EhbpFK506* que codifica para la proteína de unión FK506. La identificación de los genes correspondientes se hizo con base en su homología con las secuencias previamente reportadas en los bancos de datos.

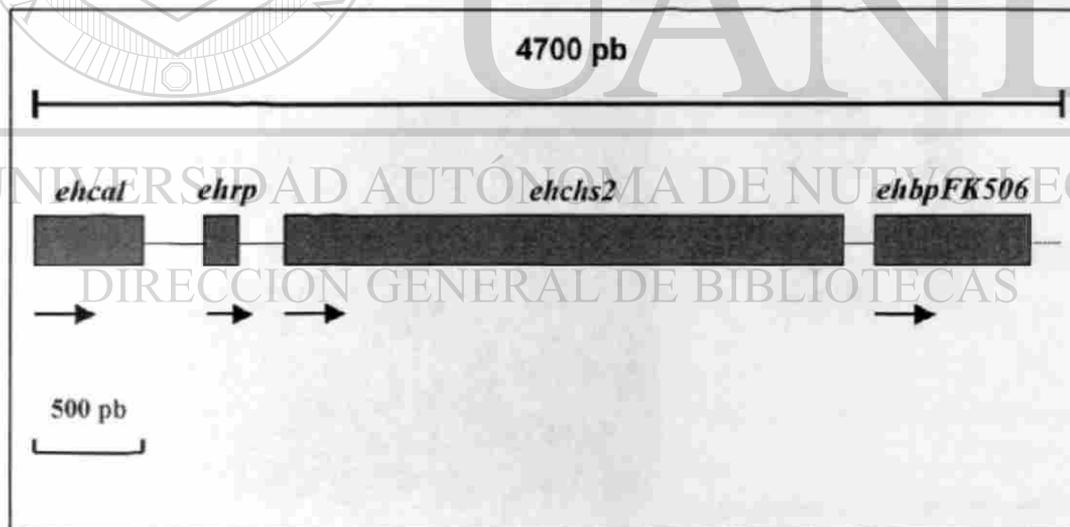


Fig. 10. Representación esquemática de la región ocupada por el gen que codifica para la quitina sintasa (EhCHS2) en el fragmento de DNA de *E. histolytica* secuenciado. Las regiones codificantes están representadas por cuadros grises y la orientación de los frente de lectura abierto (ORF) esta indicada por flechas. La asignación de los genes fue hecha con base en la homología de la secuencia deducida del DNA a la secuencia de proteínas conocidas en las bases de datos. cal, calmodulina; rp, proteína ribosomal L39; chs2, quitina sintasa; bpFK506, proteína de unión FK506.

4.11 Análisis del gen EhCHS2 de *E. histolytica*

4.11.1 Análisis tipo Southern blot

Para el análisis de Southern blot, el fragmento de DNA de 910 pb correspondiente a la región central (nucleótidos 1080 al 1989) del gen EhCHS2 se usó como sonda para realizar la hibridación con el DNA de *E. histolytica*. El análisis se hizo bajo las mismas condiciones que las usadas con el gen EhCHS1. En la Fig. 11 se muestra el resultado de dicha hibridación; se observa la presencia de una sola banda correspondiente al producto de la hibridación específica con el DNA de la sonda EhCHS2. Este resultado permite determinar la presencia de un solo gen EhCHS2 en el genoma de *E. histolytica*.

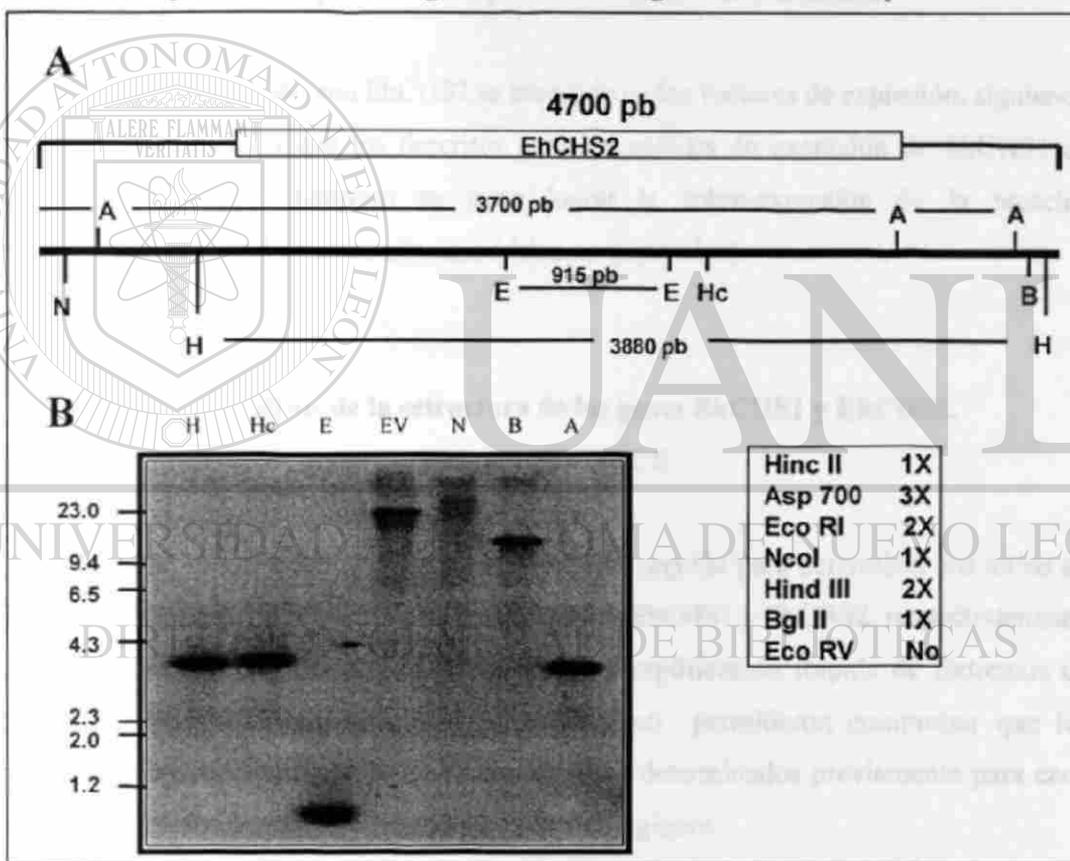


Fig. 11. Análisis tipo Southern blot del gen EhCHS2 de *E. histolytica*.

A) Representación esquemática de la secuencia total de DNA determinada (aprox. 4 Kb). Se indican los sitios de corte predichos en la secuencia (con ayuda del Programa DNASIS); también se indica el tamaño de los fragmentos esperados en la digestión con cada una de las enzimas.

B) El DNA genómico de *E. histolytica* (80 µg/línea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción Hinc II, Asp 700, Eco RI, Nco I, Hind III, Bgl II y Eco RV. Después de la separación de las muestras por medio de electroforesis, se hizo la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó un fragmento de DNA de 910 pb correspondiente a la región catalítica del gen EhCHS2, marcado con ³²P. En el lado izquierdo de la imagen se indica en Kb, el tamaño de los marcadores de talla molecular. En el cuadro de la derecha se indica el número (X) de sitios de corte para cada una de las enzimas. Hc=Hinc II, A=Asp 700, E=Eco RI, EV=Eco RV, N=Nco I, B= Bgl II y H=Hind III.

4.11.2 Análisis tipo Northern blot

Al igual que en los ensayos con el gen EhCHS1, cuando el gen EhCHS2 se usó como sonda para hacer la hibridación sobre el RNA total de *E. histolytica* obtenido a diferentes tiempos del proceso de inducción al enquistamiento (en presencia de metales divalentes), no se pudo determinar la presencia de mRNA correspondientes a quitina sintasa de este organismo en ninguna de las diferentes etapas analizadas (datos no mostrados).

4.11.3 Expresión de la proteína en sistemas bacterianos

Cuando la secuencia del gen EhCHS2 se introdujo en los vectores de expresión, siguiendo los mismos protocolos que los descritos para los análisis de expresión de EhCHS1 en sistemas bacterianos, tampoco se pudo lograr la sobre-expresión de la proteína recombinante EhChS2 en estos sistemas (datos no mostrados).

4.12 Análisis de la estructura de los genes EhCHS1 y EhCHS2.

Ensayos tipo RACE

En las Figs. 12 y 13 se esquematiza la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación de la transcripción en los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. Los ensayos de amplificación por el método de Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (RACE= *Rapid amplification of cDNA End*) permitieron comprobar que los codones de inicio y terminación de la transcripción determinados previamente para cada uno de los genes, corresponden realmente a dichas regiones.

Los ensayos de PCR sobre el cDNA de *E. histolytica* permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 250 pb, para el gen EhCHS1 y un fragmento de aproximadamente 155 pb para el gen EhCHS2.

El análisis de la secuencia de dichos fragmentos permitió determinar que, para el gen EhCHS1, el inicio de la transcripción se encuentra aproximadamente a 75 pb en posición río arriba del codón ATG; mientras que para el gen EhCHS2, dicha región se localiza a

40 pb del codón de inicio. La cola de poli-A se localiza a 53 y 19 pb hacia el extremo 3' del codón de terminación de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente.

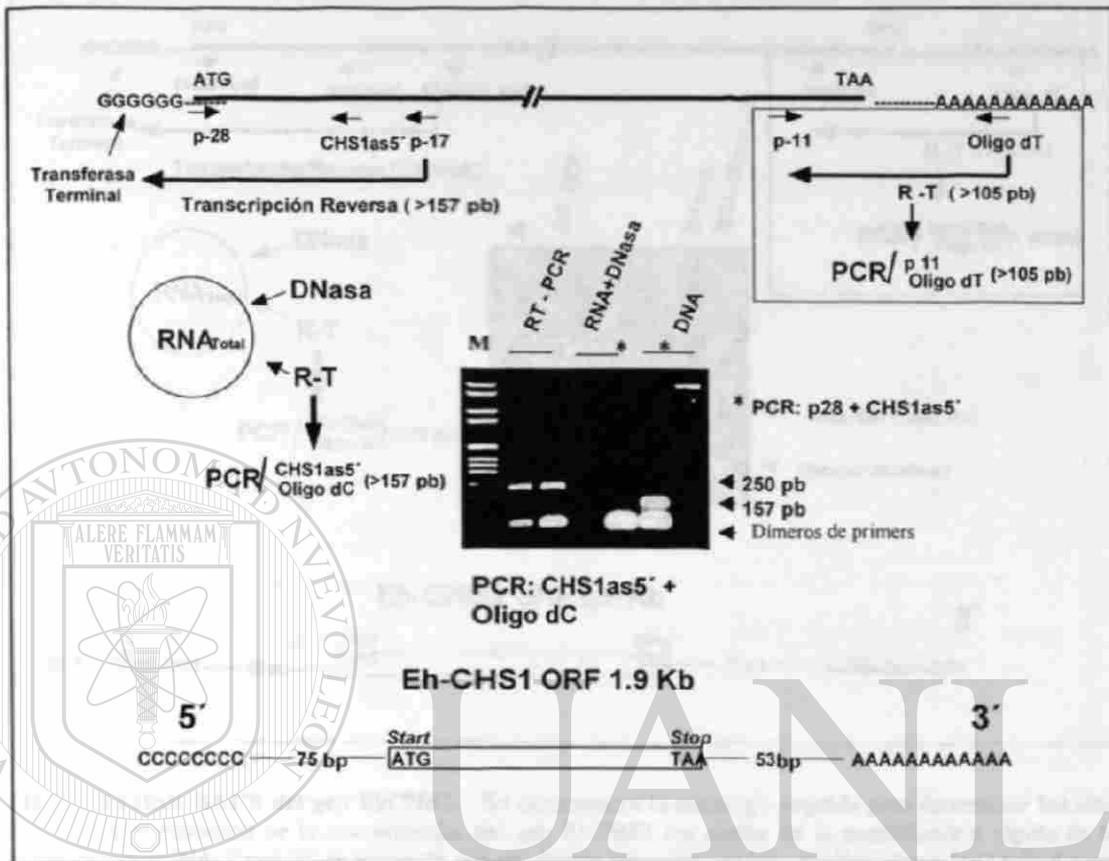


Fig. 12. Análisis RACE-PCR del gen EhCHS1. Esquema que muestra la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación del gen EhCHS1 por medio de la amplificación rápida de los extremos del cDNA. También se muestran los resultados obtenidos en los experimentos y la longitud de las regiones no traducidas resultado del análisis posterior a la clonación y secuenciación de los productos generados por RT-PCR.

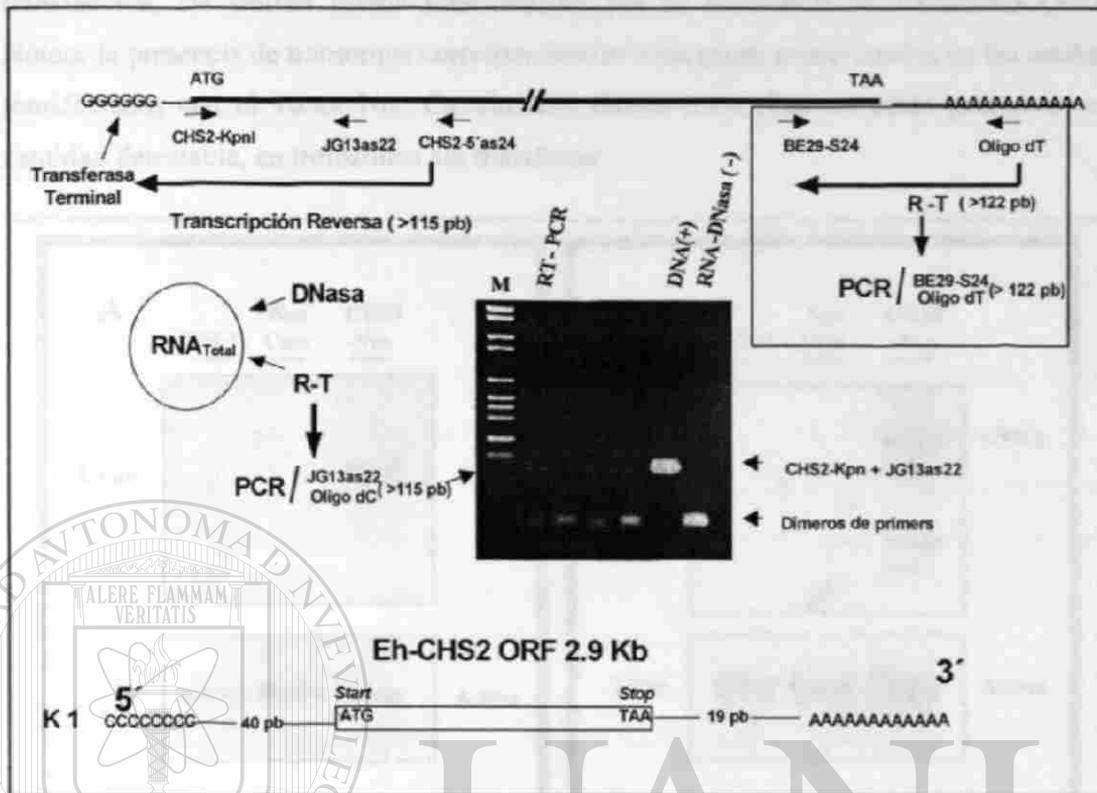


Fig. 13. Análisis RACE del gen EhCHS2. Se esquematiza la estrategia seguida para determinar los sitios de inicio y terminación de la transcripción del gen EhCHS2 por medio de la amplificación rápida de los extremos del cDNA. También se muestran los resultados obtenidos en los experimentos y la longitud de las regiones no traducidas resultado del análisis posterior a la clonación y secuenciación de los productos generados por RT-PCR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.13 Transfección de *E. histolytica* con los genes EhCHS1 y EhCHS2

4.13.1 Análisis tipo Northern blot de amibas transfectadas

Después de la transfección de *E. histolytica* con la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, se realizó la extracción del RNA para realizar los ensayos de hibridación con las sondas respectivas; comprobando de esta manera la expresión de los mensajeros codificados por las secuencias acarreadas por los vectores plasmídicos.

En la Fig. 14 se pueden observar los resultados de la hibridación con el RNA obtenido a partir de las amibas transfectadas con el vector que acarrea el gen de resistencia a

neomicina (vector NeoCass-) modificado con los genes EhCHS1 y EhCHS2. Posterior a la transfección, las amibas fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico G418. Nótese la presencia de transcritos correspondientes a los genes mencionados en las amibas transfectadas con el vector Neo Cass/inserto; dichos transcritos no están presentes, en cantidad detectable, en trofozoítos sin transfectar.

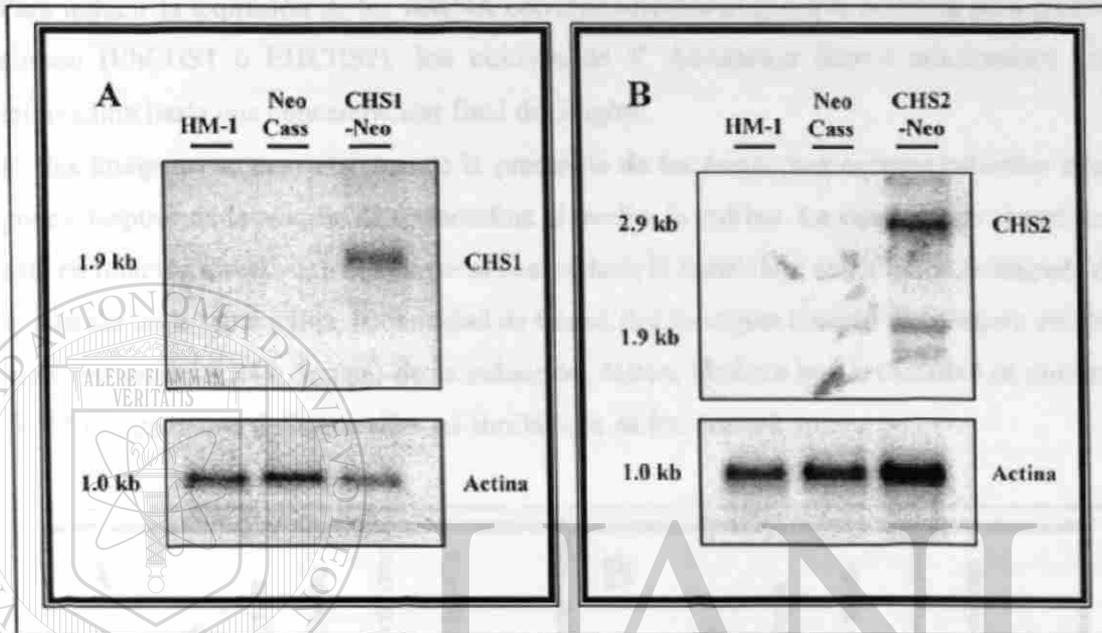


Fig. 14. Análisis tipo Northern blot de *E. histolytica* transfectada con el vector Neo Cass que acarrea los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B).

RNA total de cada una de las muestras (10 µg/línea) se depositaron en los carriles. Después de su separación por medio de electroforesis, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación en los respectivos ensayos se usaron como sondas, el fragmento total (1.9 Kb) del gen EhCHS1 y el fragmento de 910 pb correspondiente al dominio central del gen EhCHS2, marcados con ³²P. El análisis se hizo bajo las mismas condiciones que las determinadas para los anteriores ensayos Northern blot. Para comprobar la calidad y cantidad de cada muestra de RNA, sobre la misma membrana se hizo la hibridación usando como sonda un fragmento del gen de actina de *E. histolytica*. A la derecha está indicada la posición de los genes de acuerdo a su tamaño (en pares de bases).

Lineas: HMI: RNA obtenido de trofozoítos sin transfectar.

NeoCass: RNA obtenido de trofozoítos transfectados con el vector NeoCass solo.

CHS-Neo: RNA obtenido de trofozoítos transfectados con el vector Neo Cass modificado con el gen EhCHS1 o EhCHS2

En la Fig. 15 se observan los resultados de la hibridación con el RNA obtenido a partir de las amibas transfectadas con el vector que acarrea el gen de resistencia a higromicina (vector Hyg-TetR O Cass). Después de la transfección, las amibas fueron seleccionadas de acuerdo a su resistencia al antibiótico higromicina presente en el medio de cultivo (10 µg/ml).

Para inducir la expresión de los mRNA correspondientes al gen que codifica para quitina sintasa (EhCHS1 o EHCHS2), los cultivos de *E. histolytica* fueron adicionados con tetraciclina hasta una concentración final de 5 µg/ml.

En las imágenes se nota claramente la presencia de los transcritos correspondientes a los genes después de la adición de tetraciclina al medio de cultivo. La cantidad de transcritos esta en relación directa con el tiempo al cual se hizo la inducción; así, a las 48 h después de la adición de la tetraciclina, la cantidad de transcritos es mayor cuando se compara con las muestras tomadas 24 h después de la inducción. Nótese también que la cantidad de muestra (RNA) en cada uno de los carriles es similar a la de los controles.

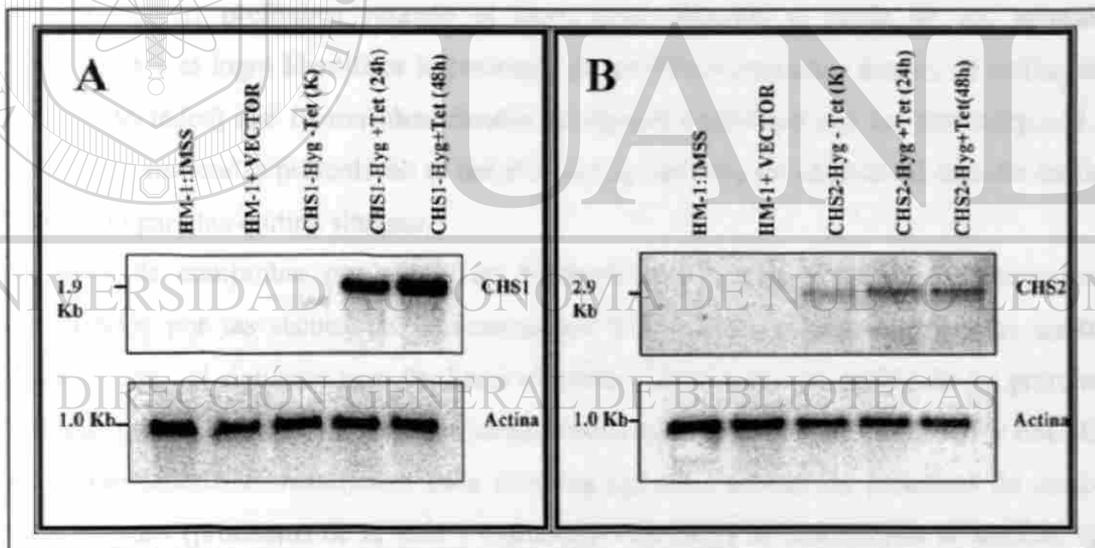


Fig. 15. Análisis tipo Northern blot de *E. histolytica* transfectada con el vector HygtetR O Cass modificado con los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B). Las condiciones experimentales son las mismas que las descritas para la Fig. 12. A la derecha está indicada la posición de los genes de acuerdo a su tamaño y a la izquierda se indica el tamaño de estos en pares de bases.

Líneas: HM1: Trofozoitos sin transfectar.

HM-1+ VECTOR: Transfectados con el vector solo

CHS1-Hyg -Tet (K): Transfectados con vector + EhCHS1

CHS1-Hyg +Tet (24h): Transfectados con vector + EhCHS1. RNA obtenido 24 h después de la inducción con tetraciclina.

CHS1-Hyg +Tet (48h): Transfectados con vector + EhCHS1. RNA obtenido 48 h después de la inducción con tetraciclina.

4.13.2 Análisis tipo Western blot

4.13.3 Detección inmunológica de las proteínas

Los anticuerpos anti-quitina sintasa de *E. histolytica* se generaron contra péptidos de 15 aminoácidos de longitud de cada una de las secuencias de los genes EhCHS; para ello, se sintetizaron las secuencias H₂N- CRLRGVERDQSYADD – CONH₂ (aminoácidos 148 al 162) y H₂N – KRIFDKYSEPPQSGC – CONH₂ (aminoácidos 291 al 305) de la secuencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente.

Para facilitar el reconocimiento de las proteínas, se buscó que dichas secuencias estuvieran sobre las regiones hidrofílicas de las presuntas proteínas para evitar que los dominios que contienen las secuencias de reconocimiento para los anticuerpos quedaran inmersas en la membrana, dificultando de esta manera su reconocimiento.

En un análisis preliminar retando el suero total obtenido a partir de los animales inmunizados se logró identificar la presencia de proteínas (extractos totales de trofozoitos no transfectados) que fueron identificadas de manera específica por los anticuerpos. Las señales identificadas presentaron el tamaño correspondiente de acuerdo al tamaño teórico calculado para las quitina sintasas.

Después de comprobar por medio de Northern blot la expresión de los mensajeros codificados por las secuencias acarreadas por los vectores plasmídicos en las amibas transfectadas, el siguiente paso fue hacer el análisis de la sobre-expresión de las proteínas quitina sintasas que se presume están siendo codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el protozooario *E. histolytica*. Para ello, los extractos totales de proteínas de amibas transfectadas (productos de la lisis y extracción con SDS) se sometieron al análisis tipo Western blot con los anticuerpos mencionados. Desafortunadamente, después de la obtención del suero total y purificación de los anticuerpos, no fue posible reproducir los resultados obtenidos con anterioridad sobre los extractos totales de trofozoitos no transfectados, ni en los extractos de las amibas transfectadas e inducidas a la expresión de las proteínas recombinantes. No sabemos si los resultados obtenidos en los ensayos preliminares fueron artefactos de las condiciones del análisis o si durante el proceso de purificación de los anticuerpos, estos sufrieron alguna modificación que les impidió posteriormente el reconocimiento de las proteínas.

Para eliminar la hipótesis de que la falta de reconocimiento por los anticuerpos se debe al enmascaramiento de los sitios específicos en las proteínas, se obtuvieron los extractos de proteínas correspondientes al precipitado y sobrenadante en el proceso de separación durante la extracción de las proteínas solubles presentes en el citoplasma y de las proteínas unidas a membrana, estas últimas obtenidas como resultado de la extracción con el detergente octil-glicosil.

Cuando estas fracciones se retaron contra los anticuerpos anti-CHS, se obtuvo el mismo resultado que en el análisis de las proteínas totales extraídas con SDS.

4.14 Análisis de la estructura primaria de las proteínas que presuntamente son codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2

La secuencia del gen EhCHS1 presenta un ORF potencial de 643 Aa mientras que el ORF deducido para EhCHS2 comprende 981 Aa.

En las Figs. 16 y 17 se observan las secuencias completas de los genes EhCHS1 y EhCHS2, respectivamente. En cada figura también se presenta la secuencia de Aa deducida con base en la secuencia de nucleótidos determinada para cada gen; se indica también la posición de la secuencia usada para generar los anticuerpos.

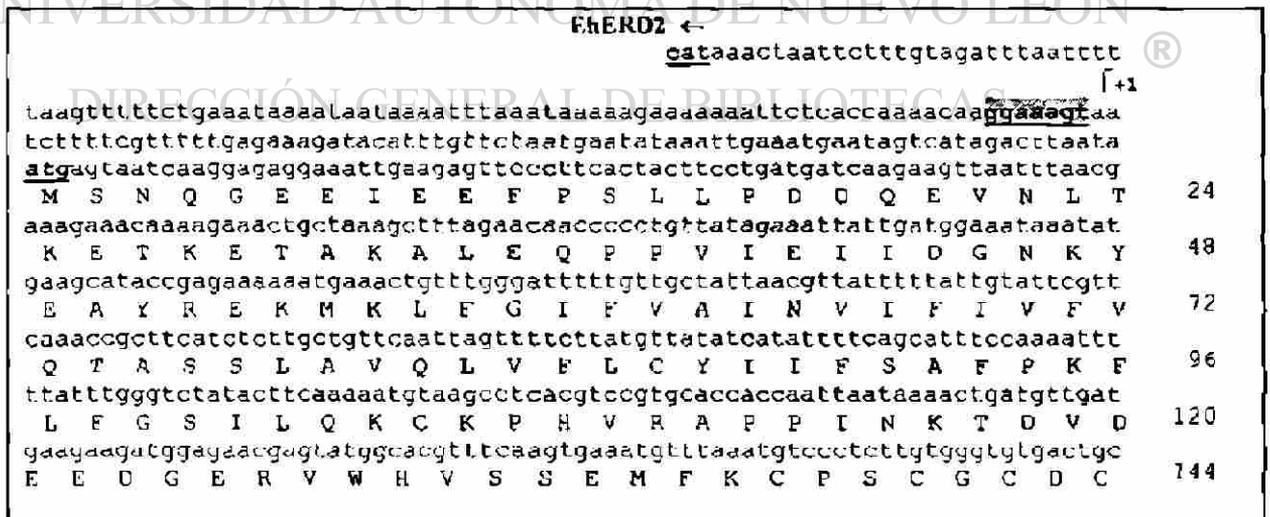


Fig. 16 Parte A.

ggtaggtcaaaattattgtacagaatgtggacaagtggtgaacatgagcatccaattttgcttagtgtttgt	
G G Q N Y C T E C G Q S V E H E H P I L L S V C	168
ttgacagttcatcatgaagatgcatctggtggttsaggggtataagaagttttgaaattagtgttttacca	
L T V H H E D A S G V E G G I R S F E I S V L P	192
tttgaaccaaagttattgtcaattaatttttggttattgatggaagaagagatagaataatgcaaattgattat	
F E P K Y C Q L I F V I D G R R D R N M Q I D Y	216
caacaactagaaacagcttcatttcatttattgttagactctgtggagttgaaagagaccaaaagttatgcagac	
Q Q L E T A S F I I C R L R G V E R D Q S Y A D	240
gatgatggtggttatttagattttaaagatggaagaggatccaagaatattagaagatggaatggctgtgtat	
D D G V I R F K D G K G D P R I L E D G M A V Y	264
gaaggaattcttgaaagtggaatgaattggattgtatttgaaaaagaaaaatggaggaaaaagcattct	
E G I L E S G M N W I V L L K K K N G G K R H S	288
catgaagtttttttggattatggatagaggaattactcgtaaaacagcaaaagcaattatgttttggtagc	
H E V F F D Y M O R G I T R K T A K A I M F V D	312
agtgtgtgaattttgcattgggaaggaatgaaagggattaatggaatgtataatgggttattaaaaaga	
S D V E F A W E G N E R G L M E M Y N G L L K R	336
gaagccatgggaggtgtttgtggagaaattgaagttgcgcattggtataaaaatccattaacaatgtgtcag	
E A M G G V C G E I E V A H W Y K N P L T M C Q	360
tattttgaaatataaatcaaatcaatttttagctaagacatttgaaaattgggttcggaatggctcacttgctta	
Y F E Y K S N Q F L A K T F E N W F G M V T C L	384
ccaggtgctttttctatgatctggccacaagctatggaacacagtattaaatgaatatttagcaacttccact	
P G A F S M I R P Q A M E T V L N E Y L A T S T	408
tcctatgggaaaagaatcagttggatcttggagaagatagaacactaaccacactcttagtgaaaaaggt	
S I W E K N Q L D L G E D R T L T T L L V E K G	432
tggtatcaggttatgttaactaagctgtttgcacatacgcagccacatttacttttagttggacttattaaa	
W D T G Y V T K A V A H T D A P F T L V G L I K	456
caagaagaagatggattaattotacaatagtcfaatatgggtattttgttacaagaattagaagaccagta	
I N S T I V N M G I L L Q R I R R P V	480
gttcttcccttgggtgtctcttgtttattgaattgtaagttcttttatgcttcttgrgctgtgttatg	
V L P L L V S L F I E L L S S F M L P C A V V M	504
ttgtllantcaaatctttgctgatgtggytaaatagaagctatttgcatttggattcttcttllggtta	
L F I Q I F A D C G V N K A I C I G V L V L W L	528
gcttcttataacattttagctcaacaagtaagattgaagatattggaatattgggttcaagcatcaaccatt	
A L L I T F S L T S K I E D M E Y W F Q A S T I	552
attgggtgatttttttagttttcttatgattattggggttatttcaaaatgtttcaggattctttgacaagcac	
L G G F L V F L M I I G V I Q N V S G F F D K H	576
tcgcttgaactttcgggttatgttgcgtgggtgtttattattgtgtttgctgcaattattcatggtcaatgg	
W L E L S V M L S W V F I I V F A A I I H G Q W	600
ttttctatatttaacgttggctccagttgtgtgggttcttttaacacctatgatgtatgcaattattcca	
F S I F N V V A P V V W F L L T P M M Y V I I P	624
atttatgcagtatgtaattttgatgatgttctgtggggaacacagaggaggatttaagaaaagatagtttaa	
I Y A V C N F D D V S W G T R G G V STOP	642
gaaaagatagtttaactctttcttaattotataacttaattatttttaaaqaaaaaaaaaaaaaaaa	
+56 Poly-AAA	

Fig. 16. continuación:

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS1 de *E. histolytica*. La secuencia de aminoácidos está indicada bajo los nucleótidos codificantes (código de una letra). La secuencia QRRRW representativa de las quitina sintasas está encerrada en un cuadro sombreado y la secuencia que fue usada como sonda en el tamizaje del banco de DNA, ensayos tipo Southern y Northern blot, está subrayada. La posición y secuencia de los péptidos que se usaron para generar los anticuerpos está indicada por letras remarcadas en negro y encerradas en un cuadro. Se indican también las secuencias de las regiones no traducidas hacia los extremos 3' y 5' del gen. La posición de los codones de inicio y terminación está indicada en cursivas subrayadas. En la región UTR 5', se puede observar la presencia del supuesto elemento iniciador de la transcripción GAAAG ubicado 75 pb "no arriba" del codón de inicio de la traducción. También se indica la posición del sitio de inicio de la transcripción (+1).

gagtaccttgbtgaatttttgggttttaatgtggtttattt[Ec]ataccacaaattattttctttcatttca
 tttgttttagggttgaaaaaaa[Ca]ttgagaataaaaatgtratttagtagtaaaaaagaaaacttaaaaa
 [+1
 aaattttaataactttttttatt[Ca]catttagctatgatttaaatgtataacttgggttcaattaaagt
 atggcaaaactocttgatactgaaaattaaaaagttgatagcaaaagtagttatttgggcaatgttaatgatt
 M A N S L I L K I K L I A K V V I G A M L M I 24
 ttaataactgtacttataacaattcacaaaatgtcagtgagtttcttattactcaattattttatttagacac
 F N T V L I T I H K M S V S F L I T Q L F I R H 48
 gatgcatttgiaccaaatgtaaltgtattaacttttgcaccaatgatgttactlatttttattgtttttataaa
 D A F V P N V I V L T F A P M M L L F Y C F Y K 72
 tatttgttctatgaagaaaactccaaaacagtcogttattttttattttattagaaggaattattgaagggggg
 Y L F Y E E T P K Q S F I F Y L L E G I I E G G 96
 tcacagggttgcattaataatttttaattttctttttatgaaaatacacacaataatattactatgttataat
 S Q G G I A L I I L I F F Y E N T Q Q Y I T M L Y 120
 attqagtttagtaccattttgtaccatttttggttcoactaagttaaaacggttgcattaaatgga
 I E L V S F V P F I C C S M P K L K R C Q L N G 144
 attatattataatcatcaatatttccaattgtaactgcagttataattagttattcattataggtttttat
 I I L L I S S I F P I V T A V I I S I H Y R F Y 168
 tggcaattattacagttgatcttttggtttggelccttattggagggtcacttaacaggggtgtcttagg
 W Q I I T V D L L F V A P Y W R S Y L T G L S R 192
 ggttatataaaaacaaatngagaaacatcgttattttacttcaattatttagagaattaaacaaaaattattggt
 G Y I K Q I E K H R Y F T S F I R E L T K I I G 216
 ttaataataggttgccttgggttattacactaatcaatataactgaacgttggwtgatcaatcaa
 L I I G C E F V Y T N Q I N P T E R W L I N Q 240
 atttactgtctccattgttggcagtttattaattccttttataacttcaaattactattttctggggaatg
 I Y L L P L C C S L L I P F I L Q I T I S W G M 264
 aaggetgctcttctattacaacagcaacactaccaatggtaatatcaattattacagctctctcactctat
 K A A L P I T T A T L P M V I S I I T A L S L Y 288
 ctttcaacatgcatgggtattggatacctgaaatttttgaggggatgtgtatttatatgocaggagatact
 L S [T C H W Y W I P E I F E G M C] I Y Y A G D I 312
 gactgggttggtttgaatgtrtttattggagttatttggttcattggttattttttaaagacttggltgaa
 D W W F E V E C F I G V F V S C C L F C K R L V E 336
 caaagaggtatataaataagacaagagatgtatggagttctctgatgtttgttggttcattttcgaat
 Q K R Y I N K T R D V W S I P D V C C V S F S N 360
 tcattattatgaaatagaqaactgatgacatttccaaaacgcaatgaggggaagtgatgaawatacattt
 S L L L N R R T D D I I Q N E M R G S D E N T F 384
 aacacaaaaagaatagttatagcgtactatgtaccatgaaacagaagttgagatgactcaactaatagag
 N T K R I V I C A T M Y H E T E V E M T Q L I E 408
 tcattcaaacgactggataacataccttcatctaaagatcatattgtattttgtattatatttgatgatca
 S F K R L D N I P S S K D H I V F C I I F D D S 432
 tgcacagttgatagactaacattatatttcaattcatttgetgaacaaattatacagattattatcaggaa
 C T V D R L T L Y F N S F A E Q I I R L L Y Q E 456
 ggagtaaaaatggaatataaagttcaatggtttgggtgcaattgctttaggagtttttaagaatggaacatca
 G V K M E Y K V Q W F G A I A L G V F K N G T S 480
 traacaatattatttaagactctcatttaataaagaaaaataaacgatatagtcagttgatgttatttaat
 L T I L F K D S H L I K K N K R Y S Q L M L F N 504
 tacqcaatcaaaacttatggaaaagaaaatacatttattctatttactgatggagatacgtacttttctct
 Y A I K T Y G K E N T F I L F T D G D T Y F S P 528
 tcttcagtaaggaattatgctettgaaatatacctaaaccaagatgtgggtgcaatttctgggagaatata
 S S V R A K L E I S S N P R C G A I S G R I Y 552
 ccagatggaaggagtttgggcatccttcaaaagtttgaatacgcgacaagtcattggttacagaaacca
 P D C K G V W A S F Q K F E Y A T S H W L Q K P 576
 gcagaggaattactggggtctgttttattgttgcctggttggtttactttacttctcttgaagcagatttat
 A F E L L G S V L C C P G C F T L L R L E A I Y 600

Fig. 17. Parte A.

gaagacaatttaagaaataaaaagaatatttgacaaatatlccagaaccacctcaaagtggctagytalltta	
E D N L R N K R I F D K Y S E P P Q S G L G I L	624
actcataactcttggtgaagataggtgggtatcatatctcttattgaaagaggatgggaattaaagtattgc	
T H N F G E D R W L S Y L L I E R G W E L K Y C	648
ctatcacaaaatctaaatcttattgtcctactacaacacagaattctttaaacaagaagaaggtgggtg	
S I T K S K S Y C P T T T Q E F F N	672
actlccactlgggctaalettattatgattatcaaaaattggatcagaattaacggaateataaaaaaatt	
T S T W A N L I M I I K N W I R I K R N N K K I	696
tcaactggattatgatatacactctcacttttatttccattctttactactccactactactcttattg	
S T G F M I Y T L L N F I S S F T T P T T L L	720
ttgatttatgggttttagtcaatttagaggttccatatactcoatattattgotttagcactttctgtttt	
L I Y G F L V N L E V P Y T H I I A L A L S V F	744
cctatattaatatttttaattattgaagttggtggtcattatttaccctgcaccatccttcgaaataggtgt	
P I L I F L I I E V V V H Y L F A P S F E I W C	768
attaatattattagtggtatttatggaatagaggtgtggttagttattgttaatttaatttattctttgata	
I N I I S G I Y G I E V L L V I V N L I Y S L I	792
actattcaacaaatatacaataaatttgatcttctgtggagctttgggttattgtrtatgtaattacaattggt	
T I Q I S I N L I F C G A L V I V I V I T I V	816
cttcatttgyaatttaatcgaattggtggaggaataataacaatttccctataccaacaacaacatotta	
L H C E F N R I V G G I I T I F L I P T T N I L	840
ttaataatatactcttttatgcatatgtotgatgtatcatggggaacaagagaaacaccatcatgaagacact	
L I I Y S F M H M S D V S W G T R E H H H E D T	864
ttacaaaaaattggttatgcacaaaactcagacattaattatattgatcaaataccaatatttacaccagag	
L Q K I V Y A Q N S D I N Y I D Q I P I F T P E	888
ctctctactgaaaaacacaataaaaaagatgagaagcaacttgaagaaaactcaatttattactatccttctt	
S S T E K H N K K M R S N L K K T Q F I T I L L	912
ttttttccaaagtttgggtgattattctttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt	
F F F T S L C W I I L S L L L M F L D Y Q Y H L	936
aagattattggaatttccattttcttttatgattgtaccaacatggttgactattcttttagttggagtacag	
K I I G I S F S E M I V P T C L T I L L V G V Q	960
tttatttctatgctatttccatagaatagattctgttggcattcctctttctcattcagagtaatttaactttt	
F I C M L F R R I D S L A F I L S R S E STOP	980
tataaatgasaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	
+18 Poly-AM	

Fig. 17. Continuación: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos del gen EhCHS2 de *E. histolytica*. La secuencia de aminoácidos está indicada bajo los nucleótidos codificantes (código de una letra). La secuencia QRRRW[®] representativa de las quitina sintasas está encerrada en un cuadro. La posición y secuencia de los péptidos que se usaron para generar los anticuerpos está indicada por letras remarcadas en negro y encerradas en un cuadro. Se indican también las secuencias no traducidas hacia los extremos 3' y 5' del gen. La posición de los codones de inicio y terminación está indicada en cursivas subrayadas. En la región UTR 5', 42 pb "rio arriba" del codón ATG, se puede observar la presencia del supuesto elemento iniciador de la transcripción GAAAG. Además, se observa la presencia de otros 3 posibles sitios de inicio de la transcripción; 2 con la secuencia CAATT y uno más con la secuencia ATCA. También se indica la posición del sitio de inicio de la transcripción (+1).

Los análisis tipo RACE para determinar la secuencia de las regiones no traducidas en ambos extremos de las proteínas se hicieron siguiendo el protocolo descrito en las figuras 12 y 13.

Como resultado de estos análisis, se pudo determinar que en el gen EhCHS1 la transcripción inicia 72 pb "rio arriba" del codón de inicio de la traducción (ATG). Cercana

a dicha posición se observa la presencia de la secuencia GAAAG, descrita como posible elemento iniciador de la transcripción (cf. ref. Ramakrishan and Petri, 2000). No se pudo identificar la presencia de elementos regulatorios de la transcripción.

En el gen EhCHS2, la transcripción inicia 42 pb "río arriba" del codón de inicio de la traducción. Esto es congruente con la presencia, en esta posición, de la secuencia GAAAG correspondiente al elemento iniciador de la transcripción.

En la región 5' no traducible de EhCHS2, se observa también la presencia de 1 elemento ATCA (situado a -127 pb del sitio de inicio de la transcripción) y 3 elementos CAATT (a -73 y -180 pb); dichos elementos se consideran posibles sitios de inicio de la transcripción (Bruchhaus *et al.*, 1993; Gangopadhyay *et al.*, 1997).

En ambos genes, la transcripción inicia en residuos de adenina (posición +1), lo cual es congruente con lo observado en estudios previos donde al parecer la maquinaria transcripcional de *E. histolytica*, al igual que la de Metazoarios, tiene predilección por residuos de adenina (cf. ref. Singh *et al.*, 1997).

A pesar de que no se pudieron localizar las características secuencias correspondientes a la caja TATA (TATTTAAA-G/C) descritas para otros genes de *E. histolytica* (Bruchhaus *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1997), la presencia de los elementos identificados sugieren fuertemente que tanto el gen EhCHS1 como el EhCHS2, son transcritos de manera monocistrónica.

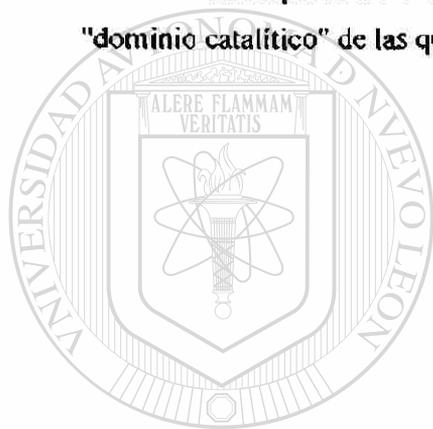
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.14.1 Comparación de EhChS1 y EhChS2 con la secuencia de otras quitina sintasas

El alineamiento pareado de las secuencias EhChS1 y EhChS2 (programa Clustal W) muestran una homología del 23% al nivel de aminoácidos (datos no mostrados); mientras que el alineamiento de las secuencias completas EhChS1 y EhChS2 (programa BLAST) con las secuencias de quitina sintasas de otras especies reportadas en los bancos de datos, muestra una similitud mayor (30 y 33%, respectivamente) a la secuencia de la quitina sintasa de *C. elegans*. Ambas secuencias presentan una similitud mayor a ChS de gusanos (*C. elegans*, *B. malayi*) e insectos (*L. cuprina*, *D. melanogaster*, *A. aegypti*) que a ChS de hongos.

4.14.2 Identificación de dominios transmembranales

En un análisis de hidrofobicidad (Fig. 18) de las proteínas EhChS (que se presume están siendo codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2) usando los parámetros del programa computacional Kyte and Doolittle (Software DNASIS), se identificaron fácilmente tres regiones: una región hidrofóbica hacia el extremo N-terminal, la cual diverge considerablemente con respecto a las otras secuencias; una región C-terminal que también presenta dominios hidrofóbicos y una región central hidrofílica. Esta última región (aprox. 350 - 400 Aa) comprende la región de mayor homología entre ambas proteínas EhCHS, y también con respecto a las ChS de otras especies. La región central es conocida como el "dominio catalítico" de las quitina sintasas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

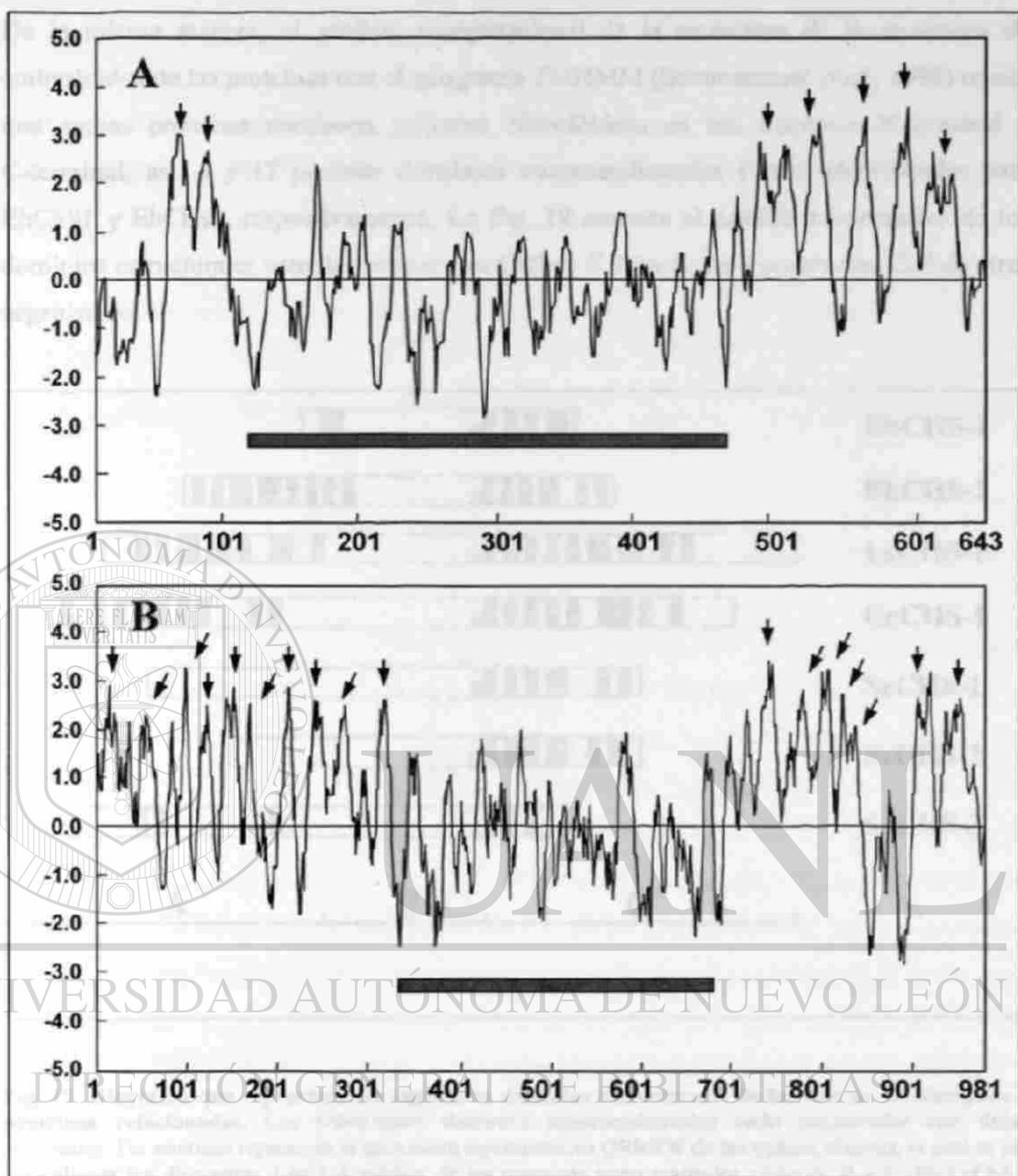


Fig. 18. Perfil de hidrofobicidad de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* codificadas por los genes EhCHS1 (A) y EhCHS2 (B). Las gráficas representan los resultados del análisis que se hizo con ayuda del programa computacional Kyte and Doolittle (Software DNASIS). Las flechas indican los picos identificados como dominios transmembranales. La línea media en cada gráfica marca el límite entre la zona hidrofóbica (números positivos) y la zona hidrofílica (números negativos). Los números debajo de cada gráfica representan la posición de los aminoácidos para cada proteína. Las barras sombreadas con líneas diagonales representan la región central hidrofílica de las proteínas (aprox. 400 Aa) que es conocida como el "dominio catalítico" de las quitina sintasas.

De la misma manera, el análisis computacional de la estructura de la secuencia de aminoácidos de las proteínas con el programa TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998) reveló que ambas proteínas contienen regiones hidrofóbicas en sus extremos N-terminal y C-terminal; así, 7 y 17 posibles dominios transmembranales fueron identificados para EhChS1 y EhChS2, respectivamente. La Fig. 19 muestra el análisis comparativo de los dominios estructurales entre las secuencias ChS de *E. histolytica* y secuencias ChS de otros organismos.

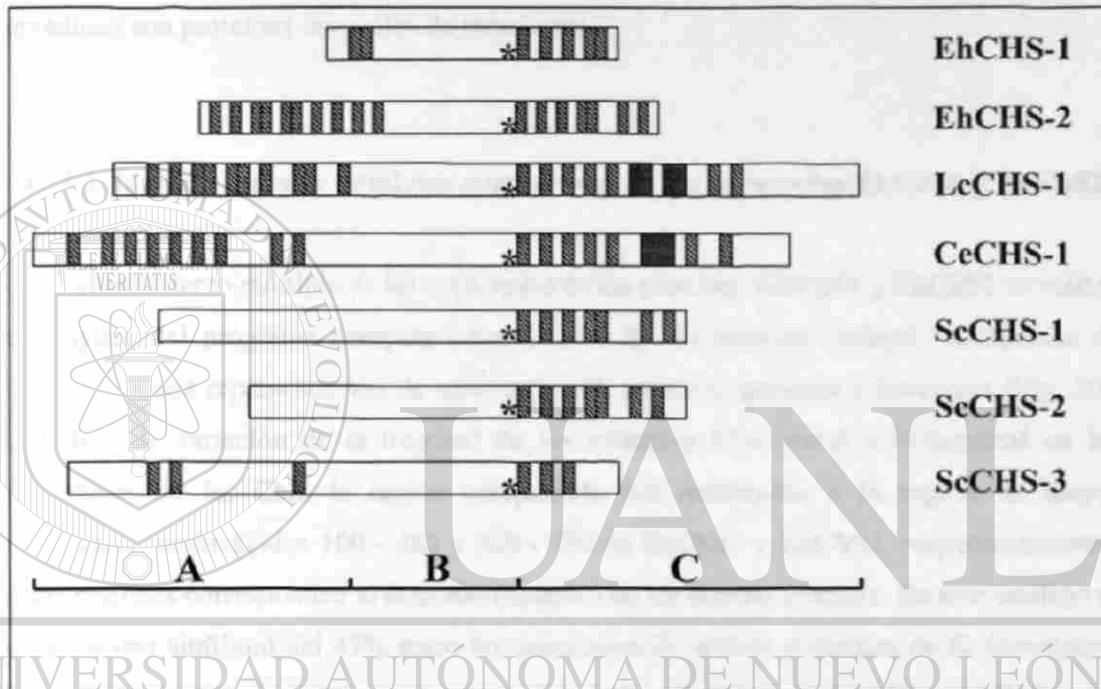


Fig. 19. Diagrama que representa los supuestos dominios estructurales de las ChS de *E. histolytica* y proteínas relacionadas. Los potenciales dominios transmembranales están sombreados con líneas diagonales. Un asterisco representa la secuencia representativa QRRRW de las quitina sintasas, la cual se usó para alinear los diagramas. Los 3 dominios de las proteínas están marcados como A, B y C. En LcChS y CeChS las supuestas regiones de α helices entrelazadas están sombreadas con líneas horizontales cruzadas (adaptado de Tellam *et al.* Eur J Biochem, 2000).

LcChS-1: ChS de *Lucilia cuprina*; DmChS-1: Gen ChS de *Drosophila melanogaster*; CeChS-1: Gen ChS de *Caenorabditis elegans*; ScChS-1, ScChS-2 y ScChS-3: Genes ChS 1, 2 y 3 de *Saccharomyces cerevisiae*; EhChS-1, EhChS-2: Genes ChS de *E. histolytica*.

En este análisis se puede observar también que la región central, la cual no contiene segmentos transmembranales, está localizada intracelularmente y que además contiene la secuencia QRRRW característica de las quitina sintasas, indicando que en esta región está probablemente el "dominio catalítico" de las ChS de *E. histolytica*.

La presencia de 10 dominios transmembranales en la región N-terminal de EhChS2, los cuales están también presentes en las proteínas de *L. cuprina* y *C. elegans*, podrían explicar los resultados del alineamiento de secuencias referentes a una mayor homología entre EhChS2 y las quitina sintasas de insectos y gusanos.

Los múltiples segmentos transmembranales predichos para las quitina sintasas de *E. histolytica* son acordes al conocimiento de que las quitina sintasas de hongos y levaduras son proteínas integrales de membrana.

4.14.3 Identificación de dominios conservados en las secuencias EhChS1 y EhChS2

Un alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas EhChS1 y EhChS2 se realizó con ayuda del programa computacional Clustal W. El análisis incluyó secuencias de quitina sintasas representativas de otras especies: insectos, gusanos y levaduras (Fig. 20). Debido a la variación de la longitud de los extremos C-terminal y N-terminal en las secuencias de las ChS, la región comparable fue restringida a la región de mayor homología (aminoácidos 100 - 480 y 320 - 700 de EhChS1 y EhChS2, respectivamente); estas regiones corresponden al dominio catalítico de las quitina sintasas. En este análisis se observó una similitud del 47% entre las secuencias de ambas proteínas de *E. histolytica*. Los dominios representados por las secuencias QxFEY, QRRRW y SWG, que presumiblemente están formando el sitio catalítico de estas enzimas, responsables de la unión al sustrato (Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998) están también presentes en las secuencias EhCHS. Además, se pueden observar otros dominios característicos identificados en las secuencias correspondientes a quitina sintasas: QxFEY, PG C/A FS, G/A EDRxL QRRRW y SWGT.

EhChS1	360	QYFEYKSNQFLAKTFENWFGMVTCLPGAFSMIR	392
EhChS2	563	QKFEYATSHWLQKPAEELLSVLCCPGCFLLR	595
LcChS1	783	QLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSPGCFSLFR	815
CeChS1	758	QKFEYAIGHWLQKATEHMIGCMCSPGCFSLFR	790
ScChS1	650	QNFYKMSNILDKTTESNFGFIIVLPGAESAYR	682
ScChS2	490	QNFYKISNILDKPLESVFGYISVLPGALSAYR	522
ScChS3	879	QVFEYIISHHOAKAFESVFGSVTCLPGCFSMYR	911
		* * * * *	
EhChS1	418	LGEDRTLTLLVEKG---WDTGYVTKAVAHTDAPFTLVGLIKORRRW	461
EhChS2	628	FGEDRWLSYLLIERG---WELKYCSITKSKSYCPTTTOEFPFNORRRW	671
LcChS1	843	QGEDRWLCTLLLRG---YRVEYSAASDAYTHCPEGFNEFFNORRRW	886
CeChS1	818	QGEDRWLCTLLLRG---YRVEYGAASDAQTFPEGFNEFFNORRRW	861
ScChS1	714	LAEDRILCFEVVTKKNCNWLKRCRSSYASTDVPERVPEFTLQORRRW	760
ScChS2	559	LAEDRILCWELVAKRDAKWLKRVKEATGETDVPEDVSEFTISORRRW	605
ScChS3	951	LGEDRFLSMLKTFP-KRKQVFPKAACKTIAPDKFKVLLSORRRW	996
		* * * * *	
EhChS1	616	TPMMYVIPIYAVCNFDDVSWGTRG	640
EhChS2	834	IPITNILLIYSEFMHMSDVSWGTRG	858
LcChS1	1045	IPSMYLLILYSIINLNAVSWGTRG	1069
CeChS1	1020	IPSTYVFITLYSLINLNVITWGTRG	1044
ScChS1	949	SPSYINVENIYAFCNVHDLSWGTKG	973
ScChS2	783	LPFTCTLOIFAFCNTHDVSWGTKG	807
ScChS3	1094	LPIWNFVLEPSYAYWKFDDFSWDTR	1118
		* * * * *	

Fig. 20. Análisis de secuencias conservadas entre las proteínas ChS de *E. histolytica* y de especies relacionadas. Debido a la variación de la longitud de los extremos C-terminal y N-terminal en las secuencias de las ChS, la región comparable fue restringida a la región de mayor homología; estas regiones corresponden al dominio catalítico de las quitina sintasas. Los bloques sombreados indican aminoácidos conservados en las EhChS de *E. histolytica* con respecto a la secuencia de al menos uno de los otros organismos. Un asterisco representa la conservación total de los aminoácidos indicados, los cuales corresponden a aminoácidos determinados como esenciales para la función de la ChS2 de *S. cerevisiae*.

4.15 Resultado de los análisis en *E. invadens*

Desde hace mucho tiempo, se ha tomado a *E. invadens* como un sistema modelo para estudiar los aspectos relacionados con el enquistamiento en el género *Entamoeba*. Esto se debe principalmente a que, a diferencia de lo que sucede con *E. histolytica*, en el estudio de *E. invadens* se cuenta con modelos bien establecidos que permiten inducir el proceso de diferenciación de protozooario, bajo condiciones controladas *in vitro*. Sin embargo, no se ha logrado la identificación de los genes CHS en esta especie.

Bajo estas premisas, en el presente trabajo también se intentó la identificación y caracterización de los genes involucrados en la síntesis de quitina en este organismo.

4.15.1 Amplificación por PCR sobre el DNA genómico de *E. invadens*

Con los oligonucleótidos degenerados diseñados sobre las regiones conservadas de quitina sintasas para la amplificación de los genes CHS de *E. histolytica*, se hicieron ensayos de PCR para tratar de amplificar los fragmentos correspondientes a partir del DNA genómico de *E. invadens*.

Los ensayos de PCR se hicieron bajo las mismas condiciones de reacción que para *E. histolytica*, y como resultado en cada reacción se obtuvieron varios productos de amplificación.

Se trató de lograr la amplificación de productos específicos variando las condiciones de reacción. Se probó una gama de temperaturas de alineamiento en un gradiente de temperatura que fue de 35 a 50 °C. Los productos amplificados resultantes en cada reacción se clonaron y secuenciaron; desafortunadamente la secuencia determinada para cada uno de los productos no tiene homología con las secuencias de quitina sintasas reportadas y algunas de ellas presentan un marco de lectura abierto cuya secuencia corresponde, por homología a otras proteínas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.15.2 Análisis tipo Southern blot sobre el DNA de *E. invadens* usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2

Para la hibridación en los ensayos tipo Southern blot, el DNA de *E. invadens* se digirió previamente con las enzimas de restricción *Bgl* II, *Eco* RI, *Nde* I, *Asp* 700 y *Hind* III; como sonda se usó el gen completo EhCHS1 (1.9 Kb) o un fragmento de 910 pb correspondiente a la región central del gen EhCHS2 de *E. histolytica*, marcados con ³²P. Las condiciones de hibridación fueron de menor exigencia (temperatura de hibridación: 30 °C; temperatura de lavados: 40°C) que las usadas durante la hibridación en los ensayos de Southern blot con *E. histolytica*.

En la Fig. 21 se muestra el resultado de la hibridación. Se puede ver, en cada análisis, la presencia de una sola banda que presumiblemente corresponde a los genes EiCHS1 y EiCHS2, respectivamente (esto a reserva de comprobarlo con DNA digerido con un mayor número de enzimas de restricción y con una sonda específica para ChS de *E. invadens*).

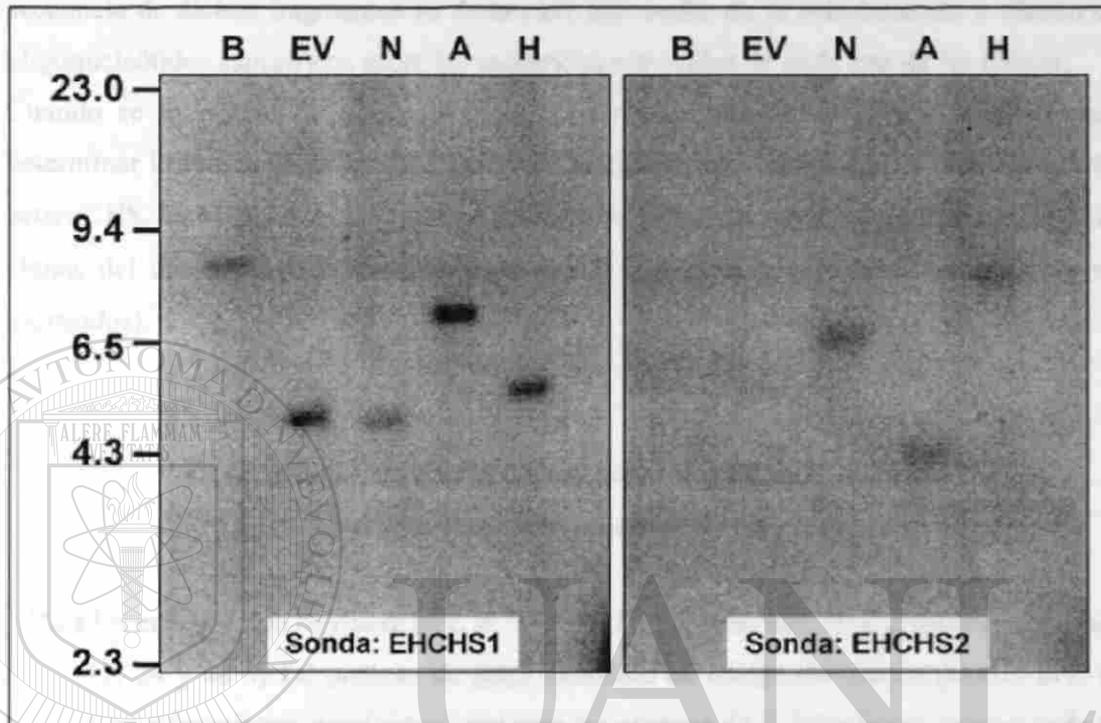


Fig. 21. Análisis tipo Southern blot de *E. invadens* usando como sonda los genes EhCHS1 y EhCHS2 de *E. histolytica*. El DNA genómico de *E. histolytica* (80 µg/línea) se digirió con cada una de las enzimas de restricción *Bgl* II, *Eco* RV, *Nde* I, *Asp* 700 y *Hind* III. Después de la separación de las muestras por medio de electroforesis, se hizo la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa. Para la hibridación se usó como sonda el gen EhCHS1 de *E. histolytica* (A) y posteriormente, un fragmento de DNA (910 pb) correspondiente al gen EhCHS2 de *E. histolytica* (B), marcados con 32 P. En el lado izquierdo de la imagen se indica en Kb, el tamaño de los marcadores de talla molecular. B= *Bgl* II, EV=*Eco* RV, N=*Nde* I, A=*Asp* 700 y H=*Hind* III.

4.15.3 Tamizaje de la biblioteca de DNA de *E. invadens* construida en el bacteriófago λ EMBL4

Ante los resultados obtenidos en los ensayos de Southern blot, se decidió realizar el tamizaje de una biblioteca de DNA de *E. invadens* construida en el bacteriófago λ EMBL4 Usando como sonda el gen completo EhCHS1 de *E. histolytica*. Las condiciones de hibridación durante el tamizaje fueron las mismas que para los ensayos tipo Southern.

Como resultado del tamizaje se aislaron 3 clonas que presentaron señal positiva durante la hibridación. A juzgar por los resultados obtenidos de la digestión con la enzima *Eco* RI, cada una de las clonas presentó un patrón de restricción diferente (datos no mostrados). Los fragmentos (aprox. 5 Kb) de dos de las clonas se clonaron en el vector pBS y la secuencia de dichos fragmentos se determinó por medio de la subclonación y diseño de oligonucleótidos específicos sobre las secuencias conocidas de cada una de las clonas. Cuando se determinó la secuencia completa de las clonas y se hizo el análisis para determinar la presencia de un ORF que correspondiera, por homología, a la secuencia de genes CHS, los resultados no fueron satisfactorios; es decir la secuencia que acarrean estas clonas del bacteriófago λ no corresponden a la secuencia esperada de CHS (datos no mostrados).

4.15.4 Análisis tipo Northern blot sobre el DNA de *E. invadens* usando como sonda el gen EhCHS1

Para los ensayos tipo Northern blot, el RNA de *E. invadens* aislado a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 48 h) del proceso de enquistamiento en medio sin lucosa (medio LG) se procesó bajo las mismas condiciones que para los ensayos de *E. histolytica*; como sonda se usó el gen EhChS de 1.9 Kb marcado con ^{32}P , bajo las mismas condiciones de hibridación y lavados que las usadas en el ensayo tipo Southern. Desafortunadamente bajo estas condiciones no se logró la detección de una señal específica que indique la expresión del gen CHS durante el enquistamiento del organismo, y se presentó una hibridación cruzada ya que la sonda reconoció el RNA ribosomal de las muestras.

Para eliminar la hibridación inespecífica se probaron condiciones mas severas de hibridación pero los resultados tampoco permitieron el reconocimiento de mRNA específicos del gen CHS en esta especie.

5 DISCUSIÓN

5.1 Discusión

Las quitina sintasas (ChS) pertenecen a una familia de β -glycosyl transferasas procesivas, que de manera interactiva transfieren residuos de diversas hexosas a un aceptor, formando así una cadena de carbohidratos (Saxena *et al.*, 1995).

Las quitina sintasas, incluyendo las proteínas nodC y la ChS1 de *S. cerevisiae* (Bulawa *et al.*, 1986) forman un subgrupo de β -glycosyl transferasas. Otras enzimas de esta familia incluyen la celulosa sintasa (Acsab) de *Acetobacter xilinum* (Saxena *et al.*, 1990), la hialuronan sintasa (HasA) de *Streptococcus pyogenes* (DeAngelis *et al.*, 1993) la alginato sintasa (Alg8) de *Pseudomonas aeruginosa* (Maharaj *et al.*, 1993) y la proteína DG42 involucrada en el desarrollo del embrión en *Xenopus leavis* (Rosa *et al.*, 1988); todas las evidencias indican que estas enzimas son proteínas integrales de la membrana plasmática.

Los primeros estudios en el establecimiento de la estructura de los genes CHS que presuntamente codifican para las enzimas denominadas quitina sintasas (Bulawa *et al.*, 1986) mostraron por medio de un análisis de hidrofobicidad que el gen CHS1 de *S. cerevisiae* consta de 3 dominios. Los dominios identificados son: un dominio hidrofílico (aprox. 300 residuos) en la región N-terminal, un dominio central (aprox. 450 residuos) y un dominio hidrofóbico (aprox. 400 residuos) presente en la región C-terminal.

Aunque el conocimiento de la estructura de las quitina sintasas está restringido a secuencias primarias deducidas a partir del código genético, se sabe que la síntesis de quitina ocurre como un proceso transmembranal en una manera vectorial en la cual el sustrato se localiza en el lado intracelular y el producto sale al exterior de la membrana, dónde se localiza el polisacárido (Valdivieso *et al.*, 1999).

A la fecha, varios genes de quitina sintasa (CHS) han sido identificados en hongos y varias otras especies de protozoarios, helmintos e insectos. La mayoría de ellos son similares a los genes ScCHS1 y ScCHS2 y son clasificados en las clases I, II y III de quitina sintasas de acuerdo con la similitud de sus secuencias. El resto están agrupados en las clases IV y V de quitina sintasa, similares a ScCHS3. Mientras que los genes CHS clase V sólo se han

identificado en hongos filamentosos y sus funciones no se conocen, los genes de la clase IV, entre los que se incluye el gen ScCHS3, están involucrados en la síntesis de la mayoría de la quitina en las células de levaduras (Valdivieso *et al.*, 1999).

Identificación de quitina sintasas

Las pruebas clásicas principales para la identificación de las enzimas responsable para la síntesis de quitina son:

- (a) Medición de la incorporación de UDP-GlcNAc en el producto de la actividad enzimática. Este producto deberá ser insoluble en agua y resistente al efecto del HCl y NaOH durante el proceso de lavado.
- (b) Similitud en las secuencias nucleotídica y aminoacídica con énfasis en la conservación de los dominios y sobretodo en la conservación de los residuos implicados en el sitio activo de la presunta enzima.

En la primera prueba, la enzima deberá ser purificada previamente ya que las preparaciones de extractos crudos podrían involucrar el trabajo combinado de complejos multienzimáticos dando como resultado una interpretación falsa de la actividad correspondiente a la enzima en cuestión.

Por otra parte, y en lo referente a la síntesis de quitina, existen también enzimas cuyo producto final es la transferencia del sustrato UDP-GlcNAc hasta un producto que no necesariamente es quitina, a decir, enzimas de la familia UDP-N-Acetil-glucosaminil-transferasas. Un ejemplo de estas enzimas lo constituyen los productos de los genes NodC, que codifican para UDPGlcNAc transferasas involucradas en la formación de lipo-quitooligosacáridos (factores Nod) responsables de iniciar la morfogénesis de los nódulos de las raíces en las leguminosas (cf. ref. Barny *et al.*, 1991).

A pesar del gran número de secuencias de hongos y levaduras depositados en los bancos de datos que han sido designados como quitina sintasas, muy pocas de estas enzimas han sido caracterizadas bioquímicamente (Tellam *et al.*, 2000).

Debido a la carencia de un modelo *in vitro* que permita el enquistamiento de *E. histolytica* en condiciones axénicas, no es posible medir la actividad de las enzimas implicadas en dicho proceso. Por lo tanto, el aislamiento, purificación y caracterización de las quitina sintasas en este protozooario patógeno como un primer y firme paso para entender los fenómenos implicados en la diferenciación, es un proceso difícil de realizar. Así, la estrategia seguida para determinar la presencia de las enzimas responsables de la síntesis de quitina fue la secuenciación de los genes que codifican para estas enzimas, a partir del DNA genómico de *E. histolytica*.

En este trabajo se describen las secuencias de dos genes (EhCHS1 y EhCHS2) que reúnen las características y requerimientos necesarios para ser considerados como los genes que codifican para las quitina sintasas en el protozooario patógeno *E. histolytica*.

Presencia de los genes EhCHS1 y EhCHS2 en el genoma de *E. histolytica*

Estudios en levaduras y otros hongos han mostrado la presencia de 3 genes responsables de la síntesis de quitina, y en *S. cerevisiae* de cuando menos otros 4 genes CHS implicados en tales procesos. Por otro lado, gracias a que la secuencia del genoma de *C. elegans* y *D. melanogaster*, ha sido determinada completamente, se ha podido determinar la presencia de solo dos genes CHS en estas especies; especies que están situadas en una posición más alta en la escala evolutiva que la de los hongos.

En el género *Entamoeba*, Das y Gillin (1992) encontraron que durante el enquistamiento de *E. invadens*, la actividad de quitina sintasa aumenta de una manera dependiente del tiempo de inducción de enquistamiento. Además, mencionan la presencia de dos formas de quitina sintasa, una forma particulada y una forma soluble, cada una de las cuales tiene características y requerimientos específicos para su funcionamiento como son: requerimiento de cationes divalentes y pH.

Recientemente nuestro grupo informó que cuando los trofozoítos de *E. histolytica* son cultivados en medio suplementado con los cationes divalentes Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} se induce un proceso de diferenciación, el cual se caracteriza porque las estructuras parecidas

a quistes así formadas son resistentes al 1% del detergente SDS (Campos-Góngora *et al.*, 2000) y la presencia de una gran cantidad de un polisacárido rico en GlcNAc en dichas estructuras (Said-Fernández *et al.*, 2001); posiblemente debido a la síntesis de una mayor cantidad de quitina como resultado de la activación de la o las enzimas responsables (quitina sintasas) por efecto de la presencia de los cationes en el medio de cultivo .

Se ha descrito ampliamente que los metales divalentes Mg, Mn y Co actúan como cofactores de las quitina sintasas de hongos y levaduras (para una revisión ver Ruíz-Herrera, 1982). Cada una de las quitina sintasas analizadas requieren la presencia de uno o la combinación de dos de estos cationes para incrementar su actividad, sin que hasta el momento se haya descrito la necesidad de la presencia de los 3 cationes en conjunto para incrementar la actividad de quitina sintasa alguna en ensayos *in vitro*.

Bajo estas premisas, no es sorprendente la presencia de los dos genes CHS en el genoma de *E. histolytica*

Los análisis de Southern blot usando como sondas los genes EhCHS1 y EhCHS2 muestran patrones de hibridación diferentes para cada uno de los genes cuando el DNA de *E. histolytica* fue digerido con las mismas enzimas de restricción y se aplicaron exactamente las mismas condiciones de hibridación en cada uno de los experimentos realizados.

Estos resultados indican que las condiciones de hibridación son suficientemente estrictas como para evitar una hibridación cruzada de alguna de las sondas probadas con los genes CHS, reduciéndose así la posibilidad de la presencia de otro(s) genes CHS en el genoma de *E. histolytica*.

En posteriores "tamizajes electrónicos" del banco de datos TIGR-Entamoeba usando como sonda las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de la secuencia de los EhCHS1 y EhCHS2 no se encontraron otras secuencias homólogas a dichos genes. Lo anterior proporciona evidencias que permiten predecir la presencia únicamente de los 2 genes identificados (EhCHS1 y EhCHS2) sin que existan otro u otros posibles genes CHS en el genoma de *E. histolytica* o cuando menos en las secuencias depositadas en el banco de datos hasta el momento del análisis.

De la misma manera, los resultados de los análisis tipo Southern blot usando como sonda solo las regiones más conservadas correspondientes al dominio central (región catalítica de

la enzima) de sendos genes, no muestran evidencia de la presencia de otros genes CHS, corroborando así los resultados del análisis virtual.

Los ensayos de hibridación con las sondas mencionadas sobre el DNA de *E. histolytica* separado por electroforesis de campos pulsados (*pulsed field gel electroforesis*), mostraron que se trata de genes localizados en cromosomas distintos (datos no mostrados). Así, tomando como referencia el trabajo de Willhoeft y Tannich (1999) en el que describen el cariotipo electroforético de *E. histolytica*, los resultados indican que el gen EhCHS1 se localiza en el grupo de unión a genes número 5 mientras que el gen EhCHS2 se localiza en el grupo 8.

En el análisis de las regiones ocupadas por los genes EhCHS se encontró que los genes que flanquean a EhCHS1 son diferentes a aquellos que flanquean a EhCHS2. Estos resultados son una fuerte evidencia para suponer que, si bien las quitina sintasas de *E. histolytica* derivan de un ancestro común, la divergencia de ambos genes tuvo lugar en etapas tempranas de la evolución.

Análisis comparativo y estructural de las proteínas

El análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2, con el programa computacional TMHMM (Sonnhammer *et al.*, 1998), permitió identificar 3 regiones características de las quitina sintasas. Ambas proteínas contienen regiones hidrófobas dentro de los extremos amino-terminal y carboxi-terminal y una región central hidrofílica. Dentro de las regiones hidrofóbicas de cada estructura se identificaron secuencias que presuntamente corresponden a segmentos transmembranales.

La presencia de 10 dominios transmembranales en la región N-terminal de EhChS2, los cuales están también presentes en las proteínas deducidas de los genes LcCHS1 de *L. cuprina* y CeCHS1 de *C. elegans* (Tellam *et al.*, 2000), explica los resultados del alineamiento de las secuencias con respecto a una mayor homología entre EhCHS2 y las quitina sintasas de insectos y gusanos descritas hasta el momento.

Aunque la cantidad de segmentos transmembranales es diferente en las dos ChS de *E. histolytica*, cabe señalar que no hay una estructura consenso de la topología general de

estos dominios debido principalmente a la variación de la longitud de las secuencias ChS reportadas, variación que se localiza principalmente en los extremos de las secuencias.

La presencia de estos segmentos transmembranales sugiere fuertemente que las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* son proteínas integrales de membrana. Lo cual es acorde con el conocimiento de que las quitina sintasas ChS1, ChS2 y ChS3 de *S. cerevisiae* se encuentran formando parte integral de la membrana (Cid *et al.*, 1995).

En los modelos establecidos para la localización de las enzimas responsables de la síntesis de quitina (Tellam *et al.*, 2000), las enzimas se localizan ya sea en la membrana plasmática o dentro de estructuras intracelulares llamadas quitosomas (debido a que fueron descritas por primera vez en hongos). En el primer modelo, se supone que la síntesis de quitina se realiza en el lado citoplásmico (lugar donde se localiza el dominio catalítico de la enzima y donde ésta tiene acceso directo al sustrato (UDP-GlcNAc), y la translocación del polímero de quitina sintetizado a través de la membrana es facilitada por la presencia de los múltiples segmentos transmembranales los que probablemente estarían formando un canal que atraviesa la membrana y a través del cual el polímero de quitina es llevado al exterior. El segundo modelo supone que estas enzimas se localizan en la membrana que rodea a los quitosomas. En este modelo, el dominio catalítico (región central hidrofílica) de las quitina sintasas se encuentra en el interior de las vesículas, donde se forma el polímero de quitina. El transporte del sustrato(UDP-GlcNAc) desde el citoplasma al interior de las vesículas involucraría a los segmentos transmembranales (o probablemente a otras proteínas).

Tellam y col. (2000) proponen que la diferencia en el número de segmentos transmembranales en las quitina sintasas de insectos y gusanos con respecto al de levaduras, sugiere que estas enzimas podrían estar interactuando con la membrana plasmática de una manera diferente a como lo hacen las quitina sintasas de levaduras. Estas diferencias en la arquitectura de las quitina sintasas podrían reflejar los diferentes tipos de quitina que son producidos en levaduras y en la cutícula de insectos.

Debido a la similitud estructural de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica* con las ChS de *L. cuprina*, *D. melanogaster* y *C. elegans* descritas, podemos pensar que estas propuestas serían aplicables también para tratar de entender el proceso de síntesis de quitina en este protozoario patógeno.

Además de la presencia de los dominios transmembranales en ambos extremos de las presuntas quitina sintasas de *E. histolytica*, también se identificó una región central

hidrofílica cuya secuencia presenta el mayor porcentaje de similitud con respecto a las regiones centrales de otras quitina sintasas. Dicha región se ha denominado como la región catalítica de la enzima y sobre ella se pueden localizar los dominios estructurales de las quitina sintasas. Este dominio central contiene la secuencia QRRRW altamente conservada y característica de las quitina sintasas de hongos y levaduras (Saxena *et al.*, 1995; Cid *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 1998).

Además, los residuos que conforman las regiones conservadas EDR, QRRRW (Nagahashi *et al.*, 1995) y WGT (Yabe *et al.*, 1998) identificados por medio de análisis mutacional como esenciales para la actividad de quitina sintasa en ScChS2, están también conservados en ambas proteínas EhChS.

Es interesante mencionar que el análisis comparativo de los residuos correspondientes a las regiones EDR y QRRRW en las enzimas NodC de *Rhizobium sp*; DG42 de *Xenopus laevis*, hialuronan sintasa de *Streptococcus pyogenes* y celulosa sintasa de *Acetobacter xylinum*, muestra que en la secuencia de residuos Glu-Asp-Arg (EDR) y Gln-Arg-Arg-Arg-Trp (QRRRW) solamente Asp en EDR, Gln, la tercera Arg y Trp en QRRRW están conservados en estas enzimas y aunque la actividad catalítica de la proteína DG42 no ha sido establecida, se sabe que las enzimas hialuronan sintasa y celulosa sintasa catalizan la polimerización de oligosacáridos con enlaces β -1,4 usando UDP-azúcar como sustrato (cf. ref. Nagahashi *et al.*, 1995).

Por otra parte, el dominio WGT identificado en la región conservada *con2* de ScChS2 (Yabe *et al.*, 1998) no está presente en las proteínas NodC bacteriana y DG42 de *X. laevis*, las cuales son también conocidas como GlcNAc transferasas. Por lo tanto, cabe suponer que en las proteínas NodC y DG42 la estructura primaria de un dominio que es funcionalmente equivalente al dominio WGT es tal vez diferente de aquel de las quitina sintasas (Yabe *et al.*, 1998).

Así, quedan establecidas las diferencias que existen en los dominios considerados como cruciales para la actividad catalítica de las β -glucosiltransferasas y la presencia de potenciales residuos catalíticos (xDx, QxxRW), con respecto a enzimas consideradas como “verdaderas” quitina sintasas, donde la presencia de las secuencias EDR, QRRRW y WGT se muestran como características exclusivas de estas enzimas; características que están presentes en las presuntas ChS de *E. histolytica*, una evidencia más de que la

secuencia de los genes determinados en este trabajo corresponden a genes que codifican para las enzimas quitina sintasas del protozoario en cuestión.

Se ha determinado que el genoma de *E. histolytica* sigue un patrón de organización poco usual, donde las regiones 5' y 3' que flanquean las secuencias codificantes son muy cortas (menos de 1500 pb). En estas regiones deberán estar incluidas las secuencias promotoras, señales de inicio y terminación de la transcripción de genes contiguos así como elementos regulatorios. Por otra parte, no se sabe si la transcripción en *E. histolytica* se realiza monocistricamente (como en la mayoría de los eucariotes) o policistricamente (como en especies de kinetoplastidos (Bruchhaus *et al.*, 1991), aunque los resultados de Bruchhaus y col. (1991) muestran evidencia de que al menos el gen de la lectina de 170 kDa es transcrito de manera monocistrica. Sin embargo, los resultados de Gangopadhyay y col. (1997) muestran que las regiones no traducidas (UTR) del mRNA del gen EhPAK y la UTR 5' del mRNA del gen EhMCM3 son transcritos a partir de un segmento genómico común de 40 pb. Significando el primer reporte de un gen amibiano que está unido físicamente a un segundo gen de tal manera que sus transcritos están traslapados y no hay regiones intergénicas no traducidas entre los dos genes.

La comparación de las regiones que flanquean los extremos 5' de los genes que codifican para proteínas en *E. histolytica* permitió identificar la presencia de 3 elementos conservados en la región promotora. Una de las 3 secuencias conservadas (GTATTTAAAG/C) se localiza a -30 pb del inicio de la transcripción, el segundo elemento (AAAAATTCA) se traslapa con el sitio de inicio de la transcripción y el tercer elemento (GAAC) se encuentra en distintas posiciones entre los dos primeros elementos. Por medio de análisis posicional se demostró que la región a -30 pb controla el sitio de inicio de la transcripción (caja TATA) y se ha mostrado que este elemento está unido a una proteína, presuntamente una proteína de unión a la caja TATA (*TATA binding protein* = TBP) la cual es significativamente diferente de la TBP de eucariotes superiores y de la TBP del protozoario *Plasmodium falciparum*.

Se ha propuesto que tanto el elemento AAAAATTCA como GAAC controlan el sitio de inicio de la transcripción y que GAAC es también importante para la eficiencia del inicio de la transcripción (Ramakrishan y Petri, 2000)

La presencia de elementos TATA y elementos que controlan el inicio de la transcripción inusuales así como la presencia de un tercer elemento, indican que la maquinaria de la transcripción basal de *E. histolytica* difiere significativamente de aquella de eucariotas superiores y aún, con la de otros protozoarios (Singh *et al.*, 1997). Lo cual no es sorprendente si se considera que los promotores virales de mamíferos no funcionan en *E. histolytica*, de la misma manera que los promotores amibianos no funcionan en células de mamífero (Purdy *et al.*, 1994).

En el caso de los genes EhCHS, los ensayos tipo RACE permitieron identificar en ambos genes, la presencia de los elementos iniciadores GAAAG; y en el caso del gen EhCHS2 se identificó también la presencia de otros presuntos elementos considerados como sitios de inicio de la transcripción. Hacia el extremo 3' de los genes se identificó la presencia de la cola de poli-A. La presencia de los elementos identificados nos permiten concluir que ambos genes son transcritos de manera monocistónica y que la transcripción de sendos genes está dirigida por el elemento iniciador GAAAG.

Análisis de las proteínas recombinantes

Para probar la sobre-expresión de la proteína recombinante presuntamente codificada por el gen EhCHS1, este se clonó en dos vectores de expresión diferentes y la sobre-expresión se probó en 3 diferentes cepas de *E. coli*. Se comprobó (determinando la secuencia de las clonas) que no hay mutaciones en el DNA clonado; sin embargo los resultados de la inducción no fueron positivos, es decir, en los sistemas bacterianos no se logró inducir la sobre-expresión de las proteínas recombinantes. Una posible explicación de estos resultados en los sistemas de expresión bacterianos es que la proteína sea tóxica para *E. coli* y que por lo tanto no se logra la sobre-expresión de la proteína recombinante. Para apoyar esta suposición se realizó la búsqueda de bibliografía referente a la expresión de quitina sintasas recombinantes sin que pudiésemos obtener información acerca de su expresión en sistemas bacterianos. Las alternativas que se consideraron para solucionar este problema fue probar en otros sistemas de expresión: baculovirus-células de insecto, levaduras o probar en un sistema de expresión *in vitro*. Se decidió por este último sistema y se hicieron ensayos de transcripción-traducción *in vitro* usando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo libre de células (SpeedRead Lysate, Novagen), sin que se obtuvieran resultados satisfactorios (datos no mostrados).

Los factores medio-ambientales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas implicadas en la patogenicidad de *E. histolytica* (para una revisión ver Ramakrishan y Petri, 2000) y es razonable suponer que, de manera análoga a otros sistemas bien caracterizados de procariotes y eucariotes superiores, el control primario sobre la capacidad invasiva del parásito es ejercida al nivel de la expresión génica. Variación en los niveles de mRNA específicos se han observado como respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento; la expresión del gen de la superóxido dismutasa es inducida por radicales superóxido; el gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa (EhADH2) es inducido por etanol; la expresión del gen de actina es autorregulada; y se ha mostrado que la expresión del gen de la ferridoxina es sensitiva al crecimiento del organismo. La adquisición de resistencia a emetina se ha demostrado que está relacionada a un incremento de la expresión del mRNA de la glicoproteína P. De la misma manera, los procesos de enquistamiento estudiados usando el modelo de enquistamiento de *E. invadens* demuestran que los trofozoítos de *E. invadens* enquistándose presentan niveles elevados de ciertos mRNA, incluyendo aquellos de las quitinasas (de la Vega *et al.*, 1997). La expresión diferencial puede por lo tanto ser un factor significativo en el control de la patogenicidad del trofozoíto, incluyendo también los procesos de invasión, enquistamiento, desenquistamiento y la adaptación al medio ambiente aeróbico de los tejidos humanos después de la invasión.

Tomando en cuenta que los requerimientos/mecanismos traduccionales de *Entamoeba* son muy diferentes a los presentes tanto en células procariotas como en eucariotas, es probable que tanto los sistemas bacterianos como los elementos regulatorios presentes en el sistema de reticulocitos de mamíferos usados en nuestro análisis no sean suficientes como para dirigir la expresión de las quitina sintasas de *E. histolytica* en las condiciones probadas.

Considerando lo anterior, se decidió realizar la transfección de trofozoítos de *E. histolytica* para posteriormente inducir la expresión de las proteínas ChS. Para la transfección se usaron los sistemas de transfección estable con los vectores plasmídicos Neo-Cass (Hamann *et al.*, 1995) y Hygtet R O Cass (Hamann *et al.*, 1997) los cuales están bajo la acción del promotor del gen de lectina (Lec 485) y secuencias 5' y 3' no traducidas del gen de actina de *E. histolytica*. Además, dichos vectores acarrean también las secuencias de los genes que confieren resistencia a los antibióticos G 418 (un análogo de neomicina) e

higromicina, respectivamente. El vector plasmídico Hygtet R O Cass es inducible ya que acarrea los elementos regulatorios del operón de resistencia a tetraciclina de *E. coli*. Este sistema de expresión procariota se caracteriza por la unión de un represor Tet de respuesta a tetraciclina a una secuencia particular del operador, resultando en la represión de los genes que están dirigidos por promotores que se encuentran bajo la influencia de esta secuencia operadora. Subsecuentemente, la unión del represor puede ser abolida por la adición de concentraciones no tóxicas de tetraciclina; llevando a la expresión controlada de los genes correspondientes.

Como un primer paso para determinar el éxito de la transfección, se hizo la selección *versus* el antibiótico correspondiente y posteriormente el análisis tipo Northern blot. En este análisis se determinaron transcritos (mRNA) correspondientes a los genes EhCHS1 y EhCHS2; y, en las amibas transfectadas con el vector Hygtet R O Cass modificado con sendos genes EhCHS, fue posible el control eficiente de la transcripción, regulada ésta por tetraciclina. Sin embargo, debido a que los anticuerpos generados no reconocieron de manera específica a las proteínas EhCHS, no fue posible la detección de dichas proteínas en las amibas transfectadas.

Análisis Northern en trofozoítos inducidos al enquistamiento

Tomando en cuenta que la síntesis de quitina deberá tener lugar en el momento en que se inicia el proceso de diferenciación (enquistamiento) de *E. histolytica* para, de esta manera, proporcionar al organismo los elementos necesarios para estructurar la pared que le conferirá resistencia a condiciones adversas, sería fácil suponer que la transcripción y/o traducción de los elementos implicados deberá también tener lugar a este tiempo. Sin embargo, las evidencias que se presentan a continuación podrán ayudarnos a entender las posibles razones por las cuales no se detectó la presencia de cantidades incrementadas de mensajeros (mRNA) en los análisis tipo Northern blot y de RT-PCR en *E. histolytica* cuando esta fue inducida a un proceso de diferenciación por efecto de la adición de cationes al medio de cultivo.

Los estudios más avanzados que nos permiten conocer el proceso de síntesis de quitina se han realizado en la levadura *S. cerevisiae*. En este organismo adoptado como modelo se

han descrito 3 genes CHS que codifican para 3 proteínas que funcionan como subunidades catalíticas de las quitina sintasas. Además, se han podido identificar otros 4 genes CHS (CHS4 a CHS7) implicados en la regulación de la unidad catalítica de ChS3p, sin que a la fecha se hayan identificado proteínas con una función homóloga para las subunidades catalíticas ChS1p y ChS2p. Por otra parte, el hecho de que en este modelo cada ChS tiene una función celular diferente sugiere que la actividad de cada enzima debe ser espacial y temporalmente regulada; y aunque las ChS 1 y ChS 2 de *S. cerevisiae* se encuentran en forma de zimógeno, se ha propuesto que ChS I y ChS II son reguladas tanto en el nivel transcripcional (Pammer *et al.*, 1992) como en el nivel postraduccionnal (Choi *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1996).

De la misma manera, puede ser que las quitina sintasas de *E. histolytica* sean reguladas en el nivel postraduccionnal para lo cual podríamos suponer que las enzimas se encuentran de manera constitutiva, también en forma de zimógeno. Lo anterior puede ser avalado por los resultados del análisis de RT-PCR donde se determinó que la cantidad de mRNA correspondiente a la EhChS1 es equivalente en las muestras probadas, sin importar el grado de diferenciación del organismo.

Nuevamente, la carencia de datos referentes al enquistamiento de este organismo nos conducen a considerar los resultados obtenidos en *E. invadens* donde se demostró que ninguna de las formas de la quitina sintasa, particulada o soluble, se activa con tripsina, lo cual sugiere que esta enzima no se encuentra en forma de zimógeno en estos parásitos. La actividad enzimática de la quitina sintasa es inhibida por UDP, UDP-Glucosa y UDP-GalNAc pero no por Polioxina D o Nikkomicina (Das and Gillin, 1991). Se ha demostrado que Polioxina D y Nikkomicina son inhibidores específicos de la mayoría de ChS de hongos, insectos y crustáceos probadas hasta ahora. Estos compuestos funcionan como inhibidores por un mecanismo de inhibición competitiva, esto es, por competencia con el sustrato GlcNAc. El hecho de que estos compuestos no tengan actividad sobre las ChS de *E. invadens* nos conducen a pensar en las diferencias, tanto estructurales como de necesidades de activación e inhibición, de las ChS del género *Entamoeba* con respecto a las ChS de otros organismos, principalmente hongos y levaduras.

Sin embargo, el hecho de que la actividad de las quitina sintasas de *E. invadens* no se vea incrementada después del tratamiento con tripsina, no indica necesariamente que las

enzimas se encuentren o no, en forma de zimógeno, ya que como se discutirá más adelante, es probable que la activación de estas enzimas dependa de factores (activadores) presentes dentro del mismo entorno de la enzima, fuertemente acopladas a ésta y formando parte del complejo multienzimático responsable de dirigir la síntesis del polisacárido.

Como ya se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae* además de las proteínas ChS1, ChS2 y ChS3 consideradas como las subunidades catalíticas del complejo de síntesis de quitina, los productos de otros 4 genes (CHS4, CHS5, CHS6 y CHS7) han mostrado ser requeridos para regular la actividad de ChS III (Bulawa, 1993). Chs4p es el activador directo de la actividad de ChS III y responsable del anclaje de Chs3p al anillo de septina durante la formación del septo. Chs5p está involucrado tanto en el transporte de Chs3p en vesículas especializadas y Chs7p regula la actividad de ChS III controlando el transporte de Chs3p desde el retículo endoplásmico.

Los resultados de Trilla y col. (1999) demuestran que CHS7 es el único gen cuya transcripción se ve incrementada bajo todas las condiciones en las cuales la síntesis de quitina en *S. cerevisiae* se incrementa.

De esta manera queda demostrado que la regulación transcripcional de CHS3, el gen que codifica para la subunidad catalítica de ChS III no es el mecanismo que controla la actividad de ChS III (Choi *et al.*, 1994; Chuang y Schekman, 1996; Coss *et al.*, 1998); y que dicha función depende principalmente del transporte y localización apropiados de Chs3p (Trilla *et al.*, 1999), función que cumplen las proteínas producto de los genes CHS4 y CHS7 de *S. cerevisiae*.

Un ejemplo más de la presencia de proteínas auxiliares lo constituye la presencia de *sbe2p* y *sbe22p*. La delección de los genes correspondientes a estas proteínas conlleva a defectos en la estructura de la pared celular y los experimentos de inmuno-fluorescencia revelan que hay una localización errónea de la proteína Chs3p involucrada en la síntesis de quitina (Santos y Snyder, 2000).

Estas evidencias sugieren que además de las proteínas codificadas por los genes CHS, existen otro tipo de proteínas implicadas directamente en el transporte de Chs3p (unidad funcional de la ChS 3) hasta la periferia celular, lugar donde finalmente es capaz de llevar a cabo su función.

De la misma manera, también se han descrito proteínas auxiliares en otros sistemas modelo de síntesis de polisacáridos como β -(1-3) glucanas donde las proteínas Rho1p (pequeña subunidad de 26 kDa) y Fks1p (una proteína hidrofóbica grande) son requeridas simultáneamente para la síntesis de glucanas. No hay pruebas contundentes de que las proteínas Fks1p o su homóloga Fks2p contengan el sitio catalítico para la síntesis de glucanas pero ellas son los únicos candidatos para tal función. Su participación en la reacción de síntesis está apoyada por la co-inmunoprecipitación de Fks1p y Rho1p. Se ha propuesto para Rho1p el papel de activador de Fks1p debido a su capacidad de actuar como controlador del apagado o encendido del sistema ya que estas proteínas son activas cuando se unen a GTP e inactivas cuando se unen a GDP (para una revisión ver Cabib *et al.*, 2001).

Con esto en mente, no es difícil imaginar que el complejo sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica* requiere también la presencia de proteínas auxiliares implicadas de manera directa o indirecta en la activación de las quitina sintasas.

Es interesante hacer notar que en los ensayos tipo Northern blot con RNA de *E. invadens* inducida al enquistamiento por privación de glucosa (en medio LG) y usando como sonda fragmentos de la región catalítica de los genes EhCHS de *E. histolytica*, tampoco se observó la expresión de mRNA que pueda ser reconocido de manera específica por las sondas EhCHS en diferentes tiempos del proceso de enquistamiento, en las condiciones de hibridación usadas. Mientras que en los resultados de la hibridación en los análisis tipo Southern blot, bajo las mismas condiciones de hibridación, se observan bandas específicas al reconocimiento por parte de sondas, indicando que dichas sondas probablemente están reconociendo secuencias de DNA específicas de las quitina sintasas de *E. invadens* sin que se observe una hibridación cruzada con las sondas.

Es probable que las diferencias entre las secuencias de los genes CHS de *E. invadens* y *E. histolytica* no permitan usar los fragmentos de los genes EhCHS como sonda en condiciones que nos permitan la hibridación específica con los mRNA de la(s) quitina sintasa(s) de *E. invadens*; o, que las quitina sintasas de *E. invadens* (como probablemente también sucede con las de *E. histolytica*) se encuentran de manera constitutiva en el organismo en forma de precursores inactivos de la enzima, y que sean reguladas en el nivel postraducciona.

Sin embargo, una posible explicación para estas observaciones es la presencia en estos organismos de otra u otras proteínas que tengan un papel de cofactores o activadores para las quitina sintasas como sucede con aquellas codificadas por los genes CHS4, CHS5, CHS6 y CHS7 de *S. cerevisiae*, las cuales son requeridas como subunidades reguladoras de la actividad de la quitina sintasa III, aunque aparentemente ninguna de ellas está involucrada en la expresión de CHS3, y que las proteínas codificadas por los genes cuyas secuencias han sido determinadas (EhCHS1 y EhCHS2) solo sean la parte estructural de las quitina sintasas en un complejo multienzimático requiriendo para su función la presencia o activación de proteínas iniciadoras del proceso (análogas a la glucogenina y a la presunta quitogenina -ver más adelante-) o el transporte adecuado hasta el sitio en el cual realizarán su función.

Importancia y función de los cationes en el enquistamiento de *E. histolytica*

Las glucosil transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de residuos de azúcar desde un sustrato donador activado a una molécula aceptora. La molécula donadora es frecuentemente un nucleótido de azúcar difosfato pero puede ser también un azúcar fosfato o un disacárido. La molécula aceptora en la mayoría de los casos es una cadena creciente de carbohidratos, pero puede ser también un acarreador lipídico, o alguno de una variedad de compuestos tales como esteroides, bilirubina, flavanonas, carotenoides, proteínas, etc., que son covalentemente modificadas por glicosilación (Hundle *et al.*, 1992).

En las quitina sintasas, el sustrato obligado es UDPGlcNAc y la presencia de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (dependiendo de la especie de la enzima) es indispensable para su actividad. La significancia de este requerimiento no ha sido elucidado, pero presumiblemente refleja un papel esencial de un cation metal divalente en la unión de la quitina sintasa al sustrato (para una revisión ver Merz *et al.*, 1999).

Aunque como se discutió anteriormente, el sistema de síntesis de quitina de *S. cerevisiae* representa el modelo más completo estudiado a la fecha, sigue habiendo puntos que no están completamente entendidos en el proceso de síntesis de quitina; a decir, no es claro aún la presencia o no de un polipéptido iniciador que cumpla la función de sustrato acepto

iniciador de la reacción y sobre el cual la quitina sintasa se une de manera covalente para cumplir su función.

No se sabe si al supuesto complejo quitina sintasa-sustrato iniciador y al sitio de unión a UDP-GlcNAc implicados en los eventos de elongación de la cadena de quitina les corresponden distintas regiones del mismo polipéptido (polipéptido de quitina sintasa multienzimático) o están situados en dos diferentes polipéptidos estrechamente asociados (complejo multienzimático) (Merz *et al.*; 1999).

Debido a que el conocimiento de la estructura molecular de las ChS es limitado, el tipo de unión a GlcNAc generado por esta presunta activación o reacción inicial, el sitio en el cual esto tiene lugar y los mecanismos que causan la formación de la cadena de quitina, solo pueden ser explicados de una manera especulativa. Es necesario por lo tanto volver la vista hacia la síntesis de glucógeno dado que esto representa la única polisacárido sintasa para la cual hay más información disponible, en lo concerniente a los mecanismos de reacción.

El sistema de síntesis de glucógeno como un modelo para entender el proceso de síntesis de polisacáridos y enzimas implicadas

La síntesis de glucógeno involucra un evento de iniciación específico, mediado por una proteína especializada llamada glicogenina. La glicogenina sufre un proceso de autoglicosilación para generar un oligosacárido iniciador, el cual, cuando es suficientemente largo, soporta la acción de la glucógeno sintasa para elongar la cadena del polisacárido dando como resultado final la formación de glucógeno (Cao *et al.*, 1993).

Así, la síntesis eficiente de glucógeno requiere la acción secuencial de dos UDPGlc-transferasas: una glucógeno iniciador sintasa denominada glicogenina (GG; EC 2.4.1.186) y glucógeno sintasa propiamente dicha (GS; EC 2.4.1.11) ambas son subunidades del complejo glucógeno sintasa.

La glicogenina (GG) es una proteína auto glicosilante que inicia la síntesis de glucógeno. La glicosilación se efectúa generando primero una unión glicosil-tirosina entre el residuo de azúcar y la tirosina ubicada en la posición 194 de la secuencia de Aa (para la secuencia de Aa. ver Campbell y Cohen, 1989); y después adicionando sucesivamente más unidades

de glucosa para finalmente generar un oligómero de unidades de glucosa (en promedio 8 residuos) con enlaces α -1,4 unido a la enzima. Es sobre esta estructura aceptora que la glucógeno sintasa (GS) realiza su función de elongación de cadena para dar como resultado la formación del polisacárido (para una revisión ver Merz *et al.*, 1999).

La reacción de la GG tiene otras propiedades que claramente la distinguen de la catalizada por GS: (i) La actividad de GG se realiza solamente en presencia de concentraciones altas de varias sales (GS no es activa en tales condiciones); (ii) El pH óptimo de GG es más alto que aquel de GS (aprox. 8.5 vs. 7.0); (iii) La primera transferencia de glicosil es dependiente de Mn^{2+} , mientras los siguientes eventos de elongación proceden con Mg^{2+} (GS no es activada por Mn^{2+} , y de hecho no es afectada por ningún cation); (iv) GG no es activada por UDP-piridoxal (un marcador de afinidad específico para GS); (v) GG no es activada por glucosa-6-fosfato, un potente efector de GS; (vi) La K_m (UDPGlc) de GG es casi 10^3 veces más pequeña (esto significa que a concentraciones bajas de sustrato solamente el componente GG del complejo GS es operativo y por lo tanto genera un pool de almacenamiento de sustrato GS iniciador que está disponible para la síntesis de glucógeno cuando las condiciones sean favorables para ello (esto es, concentraciones altas de UDPGlc y efector).

Cuatro líneas de argumento pueden llevarnos a sugerir que una situación correspondiente a aquella del sistema GG/GS podría existir en una manera análoga para el sistema de síntesis de quitina: (1) La cinética de la reacción de quitina sintasa que se efectúa en la ausencia de GlcNAc; (2) Las propiedades diferenciales de GG vs. GS que se ha descrito que ocurren de manera similar entre preparaciones de quitina sintasa diferentes; (3) una función análoga de iniciador de la proteína DG42, la cual cataliza la síntesis de oligosacáridos en la formación de ácido hialurónico (conteniendo un residuo de quito-oligosacárido en su extremo reducido); y (4) la evidencia acumulada en años recientes de que una proteína iniciadora podría ser una propiedad fundamental no solo del sistema de síntesis de glucógeno sino de la síntesis de polisacáridos en general (cf. ref. Merz *et al.*, 1999).

La hipotética enzima que podría generar quito-oligosacáridos unidos covalentemente como un iniciador para la quitina sintasa *sensu stricto* sería referida como una **quitogenina**.

De la misma manera cabe señalar que la proteólisis limitada estimula fuertemente la actividad de quitina sintasa. Esto indica que la mayor parte de la mezcla de quitina sintasas de una célula podrían estar presentes en forma de una proenzima clásica previo a la

deposición del producto en el tiempo y sitio apropiados. El ejemplo más sobresaliente en el presente contexto puede ser la ChS III de *S. cerevisiae*, la cual se considera generalmente como una enzima no zimogénica y presenta una preferencia de Co^{2+} sobre Mg^{2+} como el cation activador. Sin embargo, su actividad se incrementa de manera sustancial si la preparación albergada en la membrana (extraída con detergentes), es tratada con tripsina en la presencia de UDPGlcNAc antes de la estimulación alostérica de síntesis de quitina por GlcNAc. Este tratamiento con proteasas también guarda una relación con el requerimiento de cationes del sistema de síntesis de quitina en cuestión, puesto que la actividad dependiente de tripsina es favorecida por un incremento de la concentración de Mg^{2+} y aparentemente ocurre una reversión en la preferencia de metales en la reacción. En vista de las razones 1- 4 que se mencionan más adelante, se debe considerar la posibilidad de que la estimulación de ChS III mediada por tripsina y Mg^{2+} no concierne directamente a ChS III sino a una verdadera UDP-N-acetil-glucosaminil-transferasa (UDPGlcNAc transferasa) que se encuentra fuertemente asociada a ChS III, y que es en realidad la responsable de generar un producto que promueve eficientemente la proporción total de síntesis de quitina; como ya se mencionó esta enzima hipotética recibiría el nombre de quitogenina.

- (1) Existen algunas analogías sugerentes entre los sistemas de síntesis de quitina y glucógeno.
- (2) ChS III es un complejo multienzimático (Choi *et al.*, 1994; Trilla *et al.*, 1997).
- (3) Algo de la UDPGlcNAc provista en el paso de pre-incubación con tripsina (en la ausencia de GlcNAc indiscutiblemente está reaccionando y por lo tanto es incorporada en un producto insoluble en ácidos (representando la fase 1 de la reacción general del sistema de quitina sintasa).
- (4) Las secuencias de Aa deducidas a partir de quito-oligosacárido sintasas de varios orígenes muestran una alta similitud a la secuencias de ChS fúngicas (Semino *et al.*, 1996).
- (5) La quitogenina podría ser simplemente percibida como un activador de ChS III, como se considera, por ejemplo, al producto del gen CHS4 el cual es un componente esencial del complejo ChS III.
- (6) El producto del gen CHS4 no tiene homología con alguna de las proteasas conocidas, es zimogénico y parece estar involucrado en el procesamiento del sustrato (Trilla *et al.*, 1997).

Por lo tanto, y tomando en consideración los argumentos anteriores, no es difícil pensar en la presencia de otro(s) factor(es) implicados en el sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica*. Así, la adición de cationes al medio de cultivo podría estar estimulando la acción no de las quitina sintasas propiamente dichas, sino de enzimas relacionadas que posiblemente están formando parte del sistema de síntesis de quitina, y cumpliendo una función análoga a la determinada para la glicogenina y para la presunta quitogenina en el sistema fúngico de síntesis de quitina.

5.2 Conclusiones

En los años recientes se ha hecho evidente que el polisacárido estructural quitina es sintetizado por una familia de enzimas codificada por múltiples genes CHS de quitina sintasa, y regulado por una serie de productos de genes auxiliares que influyen en la activación y localización de la quitina sintasa (Munro y Gow, 2001).

Debido a la carencia de un modelo para el enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares y procesos enzimáticos implicados en los procesos de diferenciación de dicho protozooario parásito.

En este trabajo:

- 1).- Se determinó la secuencia de 2 genes (EhCHS1 y EhCHS2) que codifican quitina sintasas en el protozooario parásito *E. histolytica*.
- 2).- La expresión de los mRNA de las quitina sintasas no aumenta cuando los trofozoítos son inducidos a la diferenciación por efecto de los cationes Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} adicionados al medio de cultivo, lo cual sugiere que las quitina sintasas se encuentran de manera constitutiva en cada una de las etapas, posiblemente en forma de precursor inactivo de la enzima.

- 3).- El análisis de la estructura primaria de las proteínas codificadas por los genes EhCHS1 y EhCHS2 revela una gran similitud con las quitina sintasas de insectos, gusanos y hongos. Dicha similitud se localiza principalmente en la región central o “dominio catalítico de la enzima”.
- 4).- Los aminoácidos identificados como esenciales para la función de las quitina sintasas de levaduras se encuentran perfectamente conservados en las quitina sintasas de *E. histolytica*.
- 5).- Ambas proteínas EhCHS presentan múltiples segmentos transmembranales en sus extremos carboxilo y amino-terminal, lo cual es indicativo de que dichas proteínas son proteínas integrales de la membrana plasmática.

5.3 Perspectivas

A pesar de décadas de investigación intensiva, muchos eventos asociados con la complejidad de formación y deposición de quitina son todavía oscuros, o sólo parcialmente entendidos. La lista incluye el control hormonal de las quitina sintasas tanto al nivel transcripcional y traduccional así como también al empaquetamiento post-traduccional de estas enzimas; tráfico y dirección de paquetes/racimos de quitina sintasa a los sitios apropiados en las células y su inserción intrincada en la membrana plasmática; activación del evento catalítico y su control o modulación; y la translocation de cadenas de quitina a través de la membrana celular, su orientación, fibrilogenesis y asociación con otros componentes estructurales extracelular tales como polisacáridos (en hongos) y proteínas cuticulares (en insectos), (Cohen E, 2001).

En el presente trabajo se determinó la secuencia de dos genes que codifican para quitina sintasas en *E. histolytica*; sin embargo, aún queda por esclarecer los mecanismos que regulan la actividad de estas enzimas en *E. histolytica*. Preguntas tales como: ¿El sistema de síntesis de quitina es un complejo multienzimático o es catalizado por enzimas autoreguladas?, ¿Las quitina sintasas son reguladas al nivel transcripcional o posttraduccional?, ¿Hay en *E. histolytica* otras proteínas cuya función esté estrechamente ligada a la activación de las quitina sintasas o implicadas en la deposición de éstas a sitios

específicos en los cuales realizarán su función?, ¿El sistema de síntesis de quitina en *E. histolytica* requiere la actividad de una enzima que sintetice los quito-oligosacáridos iniciadores de la reacción como sucede con la glucogenina o la supuesta quitogenina de hongos?, ¿Cuales son los mecanismos que regulan la actividad de estas presuntas enzimas auxiliares de las quitina sintasas?

Los datos obtenidos en este trabajo nos llevan a suponer que en *E. histolytica*, además de las quitina sintasas, existen otras enzimas implicadas en el correcto funcionamiento de los complicados sistemas de síntesis de quitina, ya sea modificando o transportando a las enzimas responsables de dicha actividad hasta los sitios apropiados en los que realizaran su función; sin olvidar también la posible presencia de una proteína inicial en el proceso (quitogenina), responsable de la síntesis del quito-oligosacárido iniciador de la reacción de síntesis de quitina.

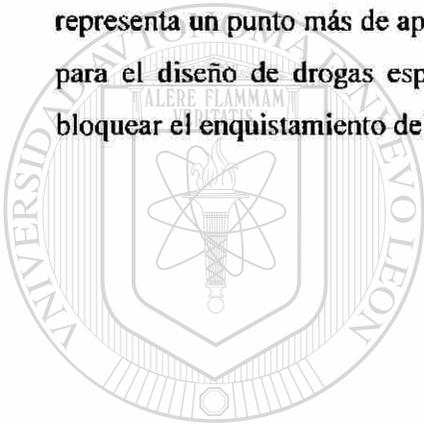
Actualmente, la carencia de un modelo de enquistamiento en *E. histolytica* dificulta la búsqueda de respuestas a preguntas tan importantes como las mencionadas anteriormente; por ello, a pesar de la poca importancia que desde el punto de vista médico tiene *E. invadens*, este parásito sigue siendo el organismo modelo para entender los eventos relacionados al proceso de enquistamiento del género *Entamoeba*, constituyendo la mejor herramienta para poder hacer los análisis correspondientes y contestar las preguntas relacionadas a dichos procesos.

Sin duda, los resultados de estudios moleculares enfocados a encontrar la respuesta a este tipo de preguntas marcarán el camino a seguir en la búsqueda del conocimiento dirigido a establecer sistemas que permitan bloquear el enquistamiento de *E. histolytica* y por ende, la transmisión de la enfermedad.

5.4 Contribuciones del presente trabajo

Las evidencias mostradas en este trabajo constituyen un paso más en el difícil camino hacia el conocimiento del proceso de síntesis de quitina en el protozooario parásito *E. histolytica*, y por consiguiente, al conocimiento de procesos involucrados en la diferenciación del organismo, específicamente en los aspectos concernientes a la síntesis de pared, organelo por demás importante en el ciclo de vida del parásito que lo capacita a ser una forma infectiva y responsable de la transmisión de la enfermedad.

El conocimiento de los genes que codifican para las quitina sintasas de *E. histolytica* representa un punto más de apoyo para que estas enzimas sean consideradas como blancos para el diseño de drogas específicas que permitan inhibir su actividad y por lo tanto, bloquear el enquistamiento del parásito.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo-Begovich A, Carabéz-Trejo A. Tinción de quistes de *Entamoeba invadens*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba coli* con aglutinina de germen de trigo marcada con partículas de oro coloidal. Arch Invest Méd (Méx). 1980; 11(supl 1):25.

Arroyo-Begovich A, Carabéz-Trejo A and Ruíz-Herrera J. Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens* J Parasitol. 1980;66:735.

Avron B, Chayen A, Stolarsky T, Schauer R, Reuter G and Mirelman D. A stage-specific sialoglycoprotein in encysting cells of *Entamoeba invadens*. Mol Biochem Parasitol. 1987;25:257-266.

Avron B, Stolarsky T, Chayen A and Mirelman D. Encystation of *Entamoeba invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. J Protozool. 1986;33:522-525.

Bailey GB and Rengpien S. Osmotic stress as a factor controlling encystation of *Entamoeba invadens*. Arch Invest Med (Mex). 1980;11(1):11-16.

Barny MA, Schoonejans E, Economou A, Johnston AW and Downie JA. The C-terminal domain of the *Rhizobium leguminosarum* chitin synthase NodC is important for function and determines the orientation of the N-terminal region in the inner membrane. Mol Microbiol. 1996; 19(3):443-453.

Bartnicki-García S. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. In *Chitin and Chitosan*. Ed. by Skjak-Braek G, Anthonsen T and Sandford P. London: Elsevier Applied Science. 1989. pp. 23-36.

Bartnicki-García S, Bracker CE, Reyes E and Ruíz-Herrera J. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils *in vitro*. Exp Mycol. 1978; 2:173-192.

Beth-Din A, Specht CA, Robbins PW and Yarden O. chs-4, a class IV chitin synthase gene[®] from *Neurospora crassa*. Mol Gen Genet. 1996; 250:214-222.

Beth-Din A and Yarden O. The *Neurospora crassa* chs-2 gene encodes a non-essential chitin synthase. Microbiol. 1994; 140: 2189-2197.

Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7(6):1513-1523.

Bond VC, Beanan MJ and Bailey GB. High resolution two-dimensional protein gel evidence of differential gene expression during *Entamoeba* encystation. Arch Med Res. 1992;23:11-13.

Bowen AR, Chen-Wu JL, Momany M, Young R, Szaniszlo PJ and Robbins PW. Classification of fungal chitin synthases. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:519-523.

Bowers B, Levin G and Cabib E. Effect of polyoxin D on chitin synthesis and septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1974; 119(2):564-575.

Bruchhaus I, Leippe M, Lioutas C and Tannich E. Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. DNA Cell Biol. 1993; 12(10):925-33.

Bulawa CE. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. Annu Rev Microbiol. 1993; 47:505-534.

Bulawa CE and Osmond BC. Chitin Synthase I and Chitin Synthase II are not required for Chitin Synthesis *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:7424.

Bulawa CE, Slater M, Cabib E, Au-Young J, Sburlati A, Adair L and Robins PW. The *Saccharomyces cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. Cell. 1986; 46(2):213-225.

Cabib E. The synthesis and degradation of chitin. Adv Enzimol. 1987;59:59-101.

Cabib E, Sburlati A, Bowers B and Silverman SJ. Chitin synthase I, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol. 1989;108:1665.

Cabib E, Shaw JA, Mol PC, Bowers B and Choi WJ. Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In: The mycota: biochemistry and molecular biology. Ed. by Brambl R and Marzluf GA. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1996; vol. 3:243-267.

Cabib E, Silverman SJ and Shaw JA. Chitinase and chitin synthase I: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol. 1992; 138(1): 97-102.

Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB and Varma A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. J Biol Chem. 2001; 276(23):19679-19682.

Campbell DG and Cohen P. The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. Eur J Biochem. 1989; 185(1):119-125.

Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora Galindo J and Said-Fernández S. Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate" Arch Med Res. 2000;31:162-168.

Cao Y, Skurat AV, DePaoli-Roach AA and Roach PJ. Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase. J Biol Chem. 1993; 268(29): 21717-21721.

Causier BE, Milling RJ, Foster SG and Adams DJ. Characterization of chitin synthase from *Botrytis cinerea*. Microbiology. 1994; 140:2199-2205.

Cid VJ, Duran A, Del Rey F, Snyder MP, Nombela C and Sánchez M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rew. 1995; 59:345-386.

Clark CG, Espinosa-Cantellano M and Bhattacharya A. *Entamoeba histolytica*: An Overview of the Biology of the Organism. In Amebiasis. Ed. by Ravdin J. Springer-Verlag, Berlin. 2000; Chap. 1:1.

Clos J and Brandau S. pJC20 and pJC40-two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 1994; 5(2):133-137.

Cohen E. Chitin Biochemistry: synthesis and inhibition. Annu Rev Entomol. 1987; 32:71-93.

Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. Pest Manag Sci. 2001; 57(10):946-950.

Coppi A and Eichinger D. Regulation of *Entamoeba invadens* encystation and gene expression with galactose and N-acetylglucosamine. Mol Biochem Parasitol. 1999; 102:67-77.

Cos T, Ford RA, Trilla JA, Duran A, Cabib E and Roncero C. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. Eur J Biochem. 1998; 256(2):419-26.

Coss T, Ford RA, Trilla JA, Durán A, Cabib E and Roncero C. Molecular analysis of ChS3p participation in chitin synthetase III activity. Eur J Biochem. 1998; 256: 419-426.

Choi WJ, Santos B, Duran A and Cabib E. Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? Mol Cell Biol. 1994; (12):7685-7694.

Choi WJ, Sburlati A and Cabib E. Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the CAL1 and the CAL3 genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(11): 4727-4730.

Chomczynski P and Sacchi N. RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) method. Anal Biochem. 1987; 162: 156-159.

Chuang JS and Schekman RW. Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. J Cell Biol. 1996; 135(3):597-610.

Das S and Gillin FD. Chitin synthase in encysting of *Entamoeba invadens*. Biochem J. 1991;280:641-647.

DeAngelis PL, Papaconstantinou J and Weigel PH. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. J Biol Chem. 1993; 268(26):19181-19184.

de la Vega H, Specht CA, Semino CE, Robbins PW, Eichinger D, Caplivski D, Ghosh S and Samuelson J. Cloning and expression of chitinases of Entamoebae. Mol Biochem Parasitol. 1997; 85(2):139-47.

DeMarini DJ, Adams AE, Fares H, De Virgilio C, Valle G, Chuang JS and Pringle JR. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J Cell Biol. 1997; 139(1):75-93.

Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica-like* amebae. J Parasitol. 1968; 54(5):1047-1056.

Diamond LS: *In vitro* methods for parasite cultivation. Ed. by Taylor AE and Baker JR. London: Academic Press. 1987.

Diamond LS, Harlow DR and Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72:431.

Eichinger D. Encystation of *Entamoeba* parasites. BioEssays. 1997;19(7):633-639.

Eichinger D. Encystation in parasitic protozoa. Current Opinion en Microbiology. 2001;4: 421-426.

Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. J Eukariot Microbiol. 2001; 48: 17-21. (b)

Farkas V. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. Microbiol Rev. 1979; 43(supl 2):117.

Frisardi M, Ghosh SK, Field J, Van Dellen K, Rogers R, Robbins P and Samuelson J. The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (*Jacob*) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. Infect Immun. 2000; 68(7):4217-4224.

Frohman MA. Rapid Amplification of Complementary DNA Ends for Generation of Full-Lenght Complementary DNAs: Thermal RACE. Methods Enzymol. 1993; 218:340-356.

Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A and Kafetzopoulos D. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32(2):141-146.

Gangopadhyay SS, Ray SS, Sinha P and Lohia A. Unusual genome organisation in *Entamoeba histolytica* leads to two overlapping transcripts. Mol Biochem Parasitol. 1997; 89(1):73-83.

Ghosh SK, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R and Samuelson J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. Infect Immun. 1999; 67(6):3073-3081.

Glaser L and Brown DH. The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. J Biol Chem. 1957;228:729.

Gold SE and Kronstad JW. Disruptions of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Mol Microbiol. 1994; 11:897-902.

Gooday GW. Biosynthesis of the fungal cell wall - mechanisms and implications. J Gen Microbiol. 1977;99:1-11.

Gooday GW. Inhibition of chitin metabolism. In Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Funji. Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW and Coppings LG eds. Berlin: Springer-Verlag; 1990.

- Hamann L, Buss H and Tannich E. Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 84(1):83-91.
- Hamann L, Nickel R and Tannich E. Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(19):8975-8979.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 1983; 166(4):557-580.
- Harris MT, Lai K, Arnold K, Martinez HF, Specht CA and Fuhrman JA. Chitin synthase in the filarial parasite *Brugia malayi*. Mol Biochem Parasitol. 2000; 111(2):351-362.
- Heukeshoven J und Dernick R. Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrilamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-034. 1986.
- Horsch M, Mayer C and Rast DM. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine. Eur J Biochem. 1996; 237: 476-482.
- Horsch M and Sowdhamini R. A fold prediction for the catalytic domain of chitin synthases. In: Chitin enzymology. RAA Muzzarelli (ed). Atec Edizioni, Italy. 1996; (2):447.
- Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, Beyer P and Hearst JE. Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(19):9321-9325.
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM and Christensen BM. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2000; (12):1213-1222
- Jeniaux C. La chitine dans le règne animal. Bull Soc Zool Fr. 1982.
- Johnson MS, Overington JP and Blundell TL. Alignment and searching for common protein folds using a data bank of structural templates. J Mol Biol. 1993; 231: 735-752.
- Kang MS, Elango N, Mattia E, Au-Young J, Robins PW and Cabib E. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*: purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. J Biol Chem. 1984; 259:14966.
- Klis FM. Review: cell wall assembly in yeast. Yeast. 1994;10:851-869.
- Kramer KJ and Koga D. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. Insect Biochem. 1986;16:851-877.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(259):680-685.

Leal-Morales CA, Bracker CE and Bartnicki-García S. Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:8516-8520.

López-Romero E and Villagómez-Castro JC. Encystation in *Entamoeba invadens*. Parasitol Today. 1993;9:225-227.

Lotter H, Mannweiler E, Schreiber M and Tarnich E. Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol. 1992; 30(12):3163-3167.

Lushbaugh WB, Miller JH. The morphology of *Entamoeba histolytica*. In Ravdin JI, Ed. Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley and Sons. 1988:41

Maharaj R, May TB, Wang SK and Chakrabarty AM. Sequence of the alg8 and alg44 genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*. Gene. 1993; 136:267-269.

Mann BJ, Torian BE, Vedvick TS and Petri Jr. WA. Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:3248-3252.

Manning-Cela R, Meraz MA, Hernández JM and Meza I. Actin mRNA levels and actin synthesis during the encystation of *Entamoeba invadens*. J Eukaryot Microbiol. 1994;41:360-365.

Martínez-Palomo A. Cell Biology, The Cyst. In The Biology of *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons. 1982:56.

Martínez-Palomo A. Biology of *Entamoeba histolytica*: Cyst differentiation. In Human Parasitic Diseases: Amebiasis. Ed by Martínez-Palomo. Elsevier, New York. 1986.

McMurrough I and Bartnicki-García S. Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. J Biol Chem. 1971; 246:4008.

Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW and Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Mol Gen Genet. 1995; 246:353-359.

Merz RA, Horsch M, Nyhlén LE and Rast DM. Biochemistry of chitin synthase. In Chitin and Chitinases. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;9-37.

Miyazaki A and Ootaki T. Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeunus*. J Gen Appl Microbiol. 1997; 43:333-340.

Munro CA and Gow NA. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. Med Mycol. 2001; 39(1):41-53.

Muzzarelli RAA. Chitin. Pergamon Press, Oxford. 1977.

Muzzarelli R, Jeuniaux C and Gooday GW. Chitin in Nature and Technology. New York: Plenum Press. 1986.

Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Characterization of Chitin Synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*: Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. J Biol Chem. 1995; 270(23):13961-13967.

Neff RJ and Benton WF. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. J Protozool. 1962;9:11.

Neville AC. Biology of the arthropod cuticle. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1975.

Nickel R and Tannich E. Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(15):7095-7098.

Orlean P. Two Chitin Synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 1987; 262: 5732.

Ostrowski S, Dierick HA and Bejsovec A. Genetic Control of Cuticle Formation During Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 2002; 161(1):171-182.

Palli SR and Retnakaran A. Molecular and biochemical aspects of chitin synthesis inhibition. In Chitin and Chitinases. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;85-98.

Pammer M, Briza P, Ellinger A, Schuster T, Stucka R, Feldmann H and Breitenbach M. DIT101 (CSD2, CAL1), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. Yeast. 1992; 8(12):1089-1099.

Peberdy JF. Fungal cell walls - a review. In Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi. Edited by Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW and Coppings LG. Berlin: Springer-Verlag. 1990. pp. 5-30.

Petri Jr WA, Haque R, Lyerly D and Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. Parasitol Today. 2000;16(8):320-321.

Purdy JE, Mann BJ, Pho LT and Petri WA Jr. Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(15):7099-7103.

Ramakrishnan G and Petri Jr WA. Pathogenesis and Molecular Biology of Amebiasis. In Amebiasis. Ed. by Ravdin J. Springer-Verlag, Berlín. 2000; Chap. 4:91.

Rengpien S and Bailey GB. Differentiation of *Entamoeba*: a new medium and optimal conditions for axenic encystation of *E. invadens*. J Parasitol. 1975; 61(1):24-30.

Roncero C, Valdivieso MH, Ribas JC and Duran A. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol.* 1988; 170(4):1950-1954.

Rosa F, Sargent TD, Rebbert ML, Michaels GS, Jamrich M, Grunz H, Jonas E, Winkles JA and Dawid IB. Accumulation and decay of DG42 gene products follow a gradient pattern during *Xenopus* embryogenesis. *Dev Biol.* 1988; 129(1):114-123.

Ruiz-Herrera J. In *Proceedings of 1st International Conference on Chitin/chitosan*. Eds: Muzzarelli RAA and Pariser ER. MIT Sea Grant Program Report. 1977; pp. 11.

Ruiz-Herrera J. *Synthesis of Chitin microfibrils in vitro*. In: *Cellulose and Other Polymer Systems. Biogenesis, Structure and Degradation*. Ed. by Brown Jr. RM. Plenum Press; New York. 1982; Chap.11:207-220.

Ruiz-Herrera J. *Fungal cell wall: Structure, synthesis and assembly*. Boca Ratón: CRC Press. 1992.

Ruiz-Herrera J, León CG, Carábez-Trejo A and Reyes-Salinas E. Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* 1996;20:133-142.

Ruiz-Herrera J and Xoconostle-Cázares B. Molecular and Genetic Control of Chitin Biosynthesis in Fungi. *Arch Med Res.* 1995; 26(3):315-321.

Said-Fernández S, Campos-Góngora E, González-Salazar F, Martínez-Rodríguez H, Vargas-Villarreal J and Viader-Salvadó JM. Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material. *J Parasitol.* 2001; 87(4):919-923.

Said-Fernández S, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Rodríguez-Pérez E and Navarro-Marmolejo L. *Entamoeba histolytica* cysts with a defective wall formed under axenic conditions. *Parasitol Res.* 1993; 79:200.

Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G and Martínez-Rodríguez H. PEHPS medium: An alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82:249.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Second ed. New York. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Sánchez LB, Enea V and Eichinger D. Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67:125-135.

Sánchez-López R, Gama-Castro S, Ramos MA, Merino E, Lizardi PM and Alagon A. Cloning and expression of the *Entamoeba histolytica* ERD2 gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 92(2):355-359.

Sánchez MA, Peattie DA, Wirth D and Orozco E. Cloning, genomic organization and transcription of the *Entamoeba histolytica* α -tubulin encoding gene. *Gene.* 1994; 146: 239-244.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12):5463-5467.

Santos B, Duran A and Valdivieso MH. CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(5):2485-2496.

Santos B and Snyder M. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol*. 1997; 136(1):95-110.

Santos B and Snyder M. Sbe2p and sbe22p, two homologous Golgi proteins involved in yeast cell wall formation. *Mol Biol Cell*. 2000; 11(2):435-452.

Saxena IM, Brown Jr. RM, Fevre M, Geremia RA and Henrissat B. Multidomain Architecture of β -Glycosyl Transferases: Implications for Mechanism of Action. *J Bacteriol*. 1995;177:1419-1424.

Saxena IM, Lin FC and Brown RM Jr. Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol*. 1990; (5):673-683.

Sburlati A and Cabib E. Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1986; 261(32):15147-15152.

Selitrennikoff CP. Chitin synthase activity from the slime variant of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Acta*. 1979; 571:224-232.

Semino CE, Specht CA, Raimondi A and Robbins PW. Homologs of the *Xenopus* developmental gene DG42 are present in zebrafish and mouse and are involved in the synthesis of Nod-like chitin oligosaccharides during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(10):4548-4553.

Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Duran A and Cabib E. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol*. 1991;114(1):111-123.

Silverman SJ, Sburlati A, Slater ML and Cabib E. Chitin Synthase II is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:4735.

Singh U, Rogers JB, Mann BJ and Petri WA Jr. Transcription initiation is controlled by three core promoter elements in the *hgl5* gene of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(16):8812-8817.

Sonnhammer ELL, Von Heijne G and Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D and Sensen C, eds. AAAI Press, Menlo Park, CA. 1998; 175-182.

Southern EM. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975; 98:503-517.

Spindler DK, Spindler-Barth M and Londershausen M. Chitin Metabolism: a target for the drugs against parasites. *Parasitol Res.* 1990;76:283-288.

Tannich E, Ebert F and Horstmann RD. Primary structure of the 170-kDA surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(1):1849-1853.

Tannich E and Horstmann RD. Codon Usage in Pathogenic *Entamoeba histolytica*; *J Mol Evol.* 1992; 34:272-273.

Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarney J and Pearson RD. Insect chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem.* 2000; 267:6025-6042.

Trilla JA, Cos T, Duran A and Roncero C. Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast.* 1997; 13(9):795-807.

Trilla JA, Duran A and Roncero JC. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1999; 145(6):1153-1163.

Uchida Y, Shimmi O, Sudoh M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. II: Both full size and processed enzymes are active for chitin synthesis. *J Biochem (Tokyo).* 1996; 119(4):659-666.

Valdivieso HM, Duran A and Roncero C. Chitin Synthases in Yeast and Fungi; In *Chitin and Chitinases*. Ed. by Jollès P and Muzzarelli RAA. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1999;55-69.

Valdivieso MH, Mol PC, Shaw JA, Cabib E and Duran A. CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1991;114(1):101-109.

Van Dellen K, Ghosh SK, Robbins PW, Loftus B and Samuelson J. *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infect Immun.* 2002; 70(6):3259-3263.

Vázquezdelara-Cisneros LG and Arroyo-Begovich A. Induction of encystation of *Entamoeba invadens* by removal of glucose from the culture medium. *J Parasitol.* 1984;70: 629-633.

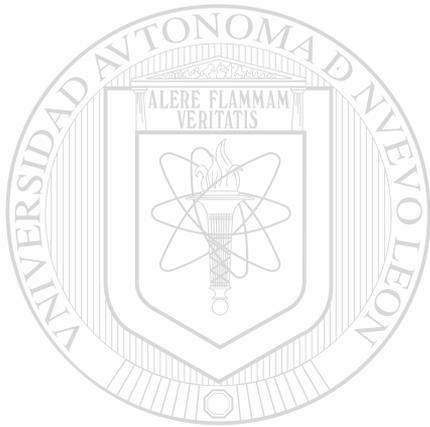
Veronico P, Gray LJ, Jones JT, Bazzicalupo P, Arbucci S, Cortese MR, Di Vito M and De Giorgi C. Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Mol Genet Genomics.* 2001; 266(1):28-34.

Villagómez-Castro JC, Calvo-Méndez C and López-Romero E. Chitinase activity in encysting *Entamoeba invadens* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;52:53-62.

Willhoeft U and Tannich E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 99(1):41-53.

Yabe T, Yamada-Okabe T, Nakajima T, Sudoh M, Arisawa M and Yamada-Okabe H. Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem.* 1998; 258(3):941-947.

Yarden O and Yanofsky C. Chitin synthase I plays a major role in cell wall biogenesis of *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 1991; 5:2420-2430.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CURRICULUM VITAE

EDUARDO CAMPOS GÓNGORA

DATOS PERSONALES:

- Nacionalidad: Mexicano
- Fecha de Nacimiento: 11.07.1965
- Lugar de Nacimiento: Poza Rica de Hidalgo, Veracruz; México.
- e-mail: educampos@hotmail.com

ESCOLARIDAD:

1972 - 1978

Primaria: Escuela Primaria "Cuauhtemoc"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1978 - 1981

Secundaria: Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 "Emiliano Zapata"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1981 - 1983

Bachillerato: Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 "Emiliano Zapata"
Poza Rica de Hgo., Veracruz; México.

1983 - 1988

Universidad: Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas Tuxpan,
Veracruz; México.

- Título: Licenciado en Biología

1993 - 1996

Maestría en Ciencias: Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios
de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, Nuevo León; México.

- Título: Maestro en Ciencias
- Especialidad: Microbiología Médica

1996-2002

Doctorado en Ciencias: Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios
de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, Nuevo León; México.

- Título: Doctor en Ciencias
- Especialidad: Microbiología Médica

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN:

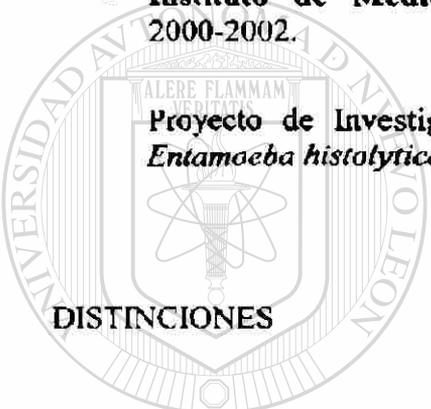
- **División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste; Instituto Mexicano del Seguro Social; México. 1993 – 1998.**

Proyecto de Investigación: “Efecto de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} sobre el Enquistamiento de *Entamoeba histolytica*”.

- **Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; México. 1998-1999.**

- **Instituto de Medicina Tropical “Bernhard Nocht”; Hamburgo, Alemania. 2000-2002.**

Proyecto de Investigación: “Clonación y Caracterización de Quitina Sintasas de *Entamoeba histolytica*”



DISTINCIONES

- **Primer lugar en aprovechamiento académico (Bachillerato); otorgado por la Dirección General de Enseñanza Media del Estado; Escuela Secundaria y de Bachilleres Oficial No. 8 “Emiliano Zapata”, Poza Rica Veracruz. México. 1982-1983.**

- **Tercer lugar en aprovechamiento académico; generación de graduados en la Carrera de Biología, otorgado por la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Veracruzana; Tuxpan, Veracruz, México. 1984-1988.**

- **Mención Honorífica en el grado de Maestro en Ciencias. División de Estudios de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas; Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; México. 1996.**

- **Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México; para realizar estudios de Maestría en Ciencias. Periodo: Marzo, 1993 - Agosto, 1995.**

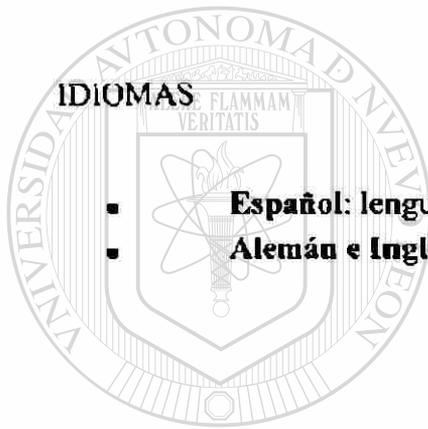
- **Recario de Investigación Medica, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Noreste: CIBIN:IMSS; México. Periodo: Marzo, 1993 - Febrero, 1998.**

- **Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México;** para realizar estudios de Doctorado en Ciencias.
Periodo: Marzo 1996-Febrero, 1999.
- **Aceptado como miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) México,** en la categoría de Candidato a Investigador Nacional. Entrada condicionada a la aceptación del artículo “Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate”. 1998.
- **Beca del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD),** para estudios de Doctorado, en Alemania.
Periodo: Octubre, 1999 – Marzo, 2002.

PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO:

- Cruz-Vega DE, Campos-Góngora E, Said-Fernández S and González-Garza MT. “*In Vitro* Additive Synergistic Antiamoebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend” *Pharmaceutical Sciences*. 1996; Vol 2 (11): pp. 509 - 511.
- Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Mora-Galindo J and Said-Fernández S. “Stimulation of *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Polysaccharide Synthesis by Three Divalent Cations” *Arch Med Res*. 1997; Vol 28; pp 141 - 142.
- Cruz-Vega DE, Campos-Góngora E, Said-Fernández S and González-Garza MT. “Determination of Antiamoebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend” *Arch Med Res*. 1997; Vol 28; pp 300 – 301.
- Campos-Góngora E, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Zuñiga-Charles MA, Mora Galindo J and Said-Fernández S. “Mg, Mn and Co Ions Enhance the formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate” *Arch Med Res*. 2000; Vol 31; 162 – 168.
- González-Salazar F, Viader-Salvadó JM, Martínez-Rodríguez HG, Campos-Góngora E, Mata-Cárdenas BD, Said-Fernández S. “Identification of seven chemical factors that favor high-quality *Entamoeba histolytica* cyst-like structures formation under axenic conditions. *Arch Med Res*. 2000; Jul-Aug;31(4 Suppl):S 192-3.

- Ute Willhoeft, Eduardo Campos-Góngora, Sassia Touzni, Iris Bruchhaus and Egbert Tannich. "Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*" *Protist*. 2001; Vol 152; 149 - 156.
- Said-Fernández S, Campos-Góngora E, Gonzalez-Salazar F, HG Martínez-Rodríguez, Vargas-Villarreal J and Viader-Salvadó JM. " Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material" *J Parasitol*. 2001; 87(4) 919-923.
- Campos-Góngora E, Willhoeft U, Said-Fernández S and Tannich E. "*Entamoeba histolytica* Chitin Synthases: Cloning and analysis of primary structure" *In preparation*.



- **Español:** lengua materna
- **Alemán e Inglés:** hablado y escrito

UANL

Ciudad Universitaria, Monterrey; N. L. Octubre del 2002.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

In-vitro Additive Synergistic Anti-amoebic Effect of a Metronidazole-Gossypol Blend

D. E. CRUZ-VEGA*, E. CAMPOS-GÓNGORA, S. SAID-FERNÁNDEZ AND M. T. GONZÁLEZ-GARZA

*División de Biología Celular y Molecular, *División de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, CP 64720, Monterrey, N.L., México*

Abstract

Gossypol has a potent anti-amoebic effect on both *Entamoeba histolytica* axenic cultures and experimental amoebic hepatic abscess. However, the margin between the in-vivo effective dose and the toxic dose in hamsters is relatively small. While metronidazole is widely used as an anti-amoebic medication, it is considered a possible carcinogen in man.

With the aid of the Basic Sequential Analytical Simplex Method we tested the effectiveness of 12 metronidazole-gossypol blends where the concentration of each drug was systematically varied. Amoebic growth inhibition was observed (33-71% with respect to controls) using blends containing metronidazole (50-154 nM) and gossypol (5-16 nM). The combination containing metronidazole (88.61 nM) and gossypol (9.95 nM) caused 62% amoebic growth inhibition. These concentrations were 50% lower than those required to produce an equivalent effect using metronidazole or gossypol alone.

Thus, the actions of metronidazole and gossypol against *E. histolytica* are additive. Accordingly, the in-vivo application of an appropriate combination of metronidazole and gossypol could be as effective as each drug alone, but less toxic to the host.

Metronidazole is one of the most widely used medications against trichomoniasis, giardiasis and amoebiasis (Webster 1991). However, due to its toxic effects on DNA (LaRusso et al 1977; Koch-Weser & Goldman 1980; Voogd 1981; Edwards 1986; Martelli et al 1990) metronidazole is considered to be a potential carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (1980). Gossypol, a polyphenol extracted from several species of cotton (*Gossypium* sp.) has potent in-vitro and in-vivo anti-amoebic activity, 39- (González-Garza & Said-Fernández 1988) and 9-times (González-Garza et al 1996) higher than that of metronidazole, respectively. Nevertheless, the margin between the most effective and lethal dose of gossypol is relatively small (González-Garza et al 1996).

We determined the anti-amoebic effect of a blend series where the concentration of metronidazole and gossypol was varied and systematically tested for possible synergistic effects.

Material and Methods

Parasites

Entamoeba histolytica HM-1: IMSS strain was used in all the experiments. The trophozoites were maintained in axenic conditions in PEHPS medium (Said-Fernández et al 1988), and were subcultured every 4 days.

Assay method

Varying concentrations of gossypol and metronidazole were added to borosilicate screw capped culture tubes, containing 11 mL fresh sterile PEHPS medium. Drugs were used alone or blended. In all determinations the metronidazole and gossypol

concentrations were maintained in a range from 0.0 to 0.020 μM and 0.0 to 0.205 μM , respectively. Metronidazole was dissolved with phosphate buffered saline (PBS). Gossypol was added with a minimum volume of NaOH 0.5N and diluted with PBS.

For experiments where gossypol-metronidazole blends were tested, the concentration of each drug was calculated following the Basic Sequential Analytical Simplex Method, (Shavers et al 1979). The analysis started with blends 1-3, where drug concentrations were equivalent to submultiples of each drug IC₅₀, (metronidazole, 204 nM and gossypol, 20 nM). The IC₅₀ values were calculated according with the method described elsewhere (González-Garza et al 1988). Blend 1 contained 0.5 IC₅₀ metronidazole with 0.5 IC₅₀ gossypol; blend 2, 0.5 IC₅₀ metronidazole, 0.25 IC₅₀ gossypol and blend 3, 0.25 IC₅₀ metronidazole with 0.5 IC₅₀ gossypol. The culture tubes, containing 11 mL medium and 1×10^3 amoebae mL⁻¹, were mixed with 50 μL of each drug solution (concentrated 200 times with respect to their final concentration). The tubes were incubated for 72 h at 36°C, cooled in ice water for 10 min and the number of trophozoites mL⁻¹ in each tube determined with a haemocytometer. Results were estimated as percentage growth inhibition with respect to untreated controls. The two combinations which produced the highest amoebic growth inhibition and the one that produced the lower inhibition were identified. The two combinations that produced the highest inhibition were used again in the following experiment. The drug blend that produced the worst results was discarded and substituted with a new combination in which the concentration of each drug was calculated using the following equation (Shavers et al 1979):

$$C_n = 2XC_b - C_a \quad (1)$$

where C_n was the new concentration of metronidazole, $2XC_b$ the metronidazole concentration average in the two blends

Correspondence: M. T. González-Garza y Burton, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, CP 64720, Monterrey, N.L., México.
E-Mail: mtgonzal@academ01.mty.itesm.mx

Stimulation of *Entamoeba histolytica* Cyst Wall Polysaccharide Synthesis by Three Divalent Cations¹

EDUARDO CAMPOS-GONGORA,**** JOSE MARIA VIADER-SALVADO,**
HERMINIA G. MARTINEZ-RODRIGUEZ,** JUAN MORA-GALINDO**** and
SALVADOR SAID FERNANDEZ*

* División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

*** Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

**** División de Biología de la Reproducción, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Monterrey, Nuevo León, Mexico

Introduction

Entamoeba histolytica is the causative parasite of amebiasis. This protozoa presents two phases in its life cycle: trophozoite and cyst. The knowledge of molecular and cell biology of cysts is still quite limited. This is mainly due to the unavailability of a method to massively produce cysts in axenic conditions (1). We recently showed that *E. histolytica* cultivated under axenic conditions in PEHPS medium forms mature cysts having a weak wall (2). The wall of *E. invadens* and natural *E. histolytica* cysts contain chitin (3). This polysaccharide is responsible for the characteristic resistance of the cyst wall. Das and Gillin in 1991 described in *E. invadens*, a chitin synthase dependent of Mn^{2+} and Co^{2+} (4). In other microorganisms Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} are chitin synthase cofactors. In the present study we analyzed the effect of variable concentrations of Mg^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} on the chitin synthesis of encysting *E. histolytica* amebas maintained in PEHPS medium in axenic conditions.

Materials and Methods

Encystation. The *E. histolytica* HM-1:IMSS strain was used in all experiments. The amebas were main-

tained in PEHPS medium (3). Glass 16 x 125 mm screw-capped tubes containing 11 ml medium were inoculated with 1×10^3 trophozoites (growing logarithmically) per ml. The cultures were incubated at 37°C for 3 days. Afterwards, the spent medium was discarded and the tubes refilled with fresh medium added with variable concentrations of $MgCl_2$, $MnCl_2$ and $CoCl_2$. Twenty combinations of divalent cations were tested, which were calculated by Simplex method (5). The cultures were incubated at 37°C for 7 days. The cysts were harvested and washed two times with double-distilled water.

Cyst Wall Resistance to Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). The cysts were resuspended in 1 ml double-distilled water, counted with a hemacytometer and distributed in aliquots of 200 μ l. Each of them was mixed with 200 μ l of variable concentrations of SDS (0-1%). The mixtures were incubated for 10 min at room temperature and the percentage of refringent cyst determined.

Polysaccharide Purification and Hydrolysis. One hundred mg of freeze-dried *E. histolytica* cysts were resuspended in 5 ml double-distilled water and sonicated (10 cycles of 75 W/30 sec). This preparation was centrifuged. The resultant pellet was washed three times and incubated with 5 ml 2 N HCl. Then the resistant material was washed two times with double-distilled water, resuspended in 1.0 ml ethanol: 1 N NaOH (2:1), heated in boiling water for 5 min and filtered through a microfiber-glass filter. The filter was washed with 3 ml double-distilled water and the eluted material freeze-dried.

Correspondence to:

Dr. Salvador Said Fernández, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Apdo Postal 020-E, Col. Independencia, Monterrey, Nuevo León 64720 México, Tel (8) 343-1251, FAX: (8) 344-4116

Presenting author: Eduardo Campos Gongora

¹ This project was partially supported by CONACYT, México, Grants 264100-5-1379PM and F32-M9212. A fellowship was awarded to ECG by CONACYT

Determination of the Antiamebic Effect of a Metronidazole/Gossypol Blend¹

DELIA ELBA CRUZ-VEGA,** EDUARDO CAMPOS-GONGORA,*
SALVADOR SAID-FERNANDEZ* and MARIA TERESA GONZALEZ-GARZA*

*División de Biología Celular y Molecular

**División de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Monterrey, Nueva León, México

Introduction

Metronidazole is one of the most widely used medication against Trichomoniasis, Giardiasis and Amebiasis (1). However, due to its toxic effects on DNA (2-6), metronidazole is considered a potential carcinogenic chemical by the International Agency for Research on Cancer (7). On the other hand, gossypol, a polyphenol extracted from several species of cotton (*Gossypium sp.*) has a potent *in vitro* and *in vivo* antiamebic activity; these being, respectively, 39 (8) and nine times higher than that of metronidazole. Nevertheless, the margin between the most effective and lethal doses of gossypol is relatively narrow (9).

Materials and Methods

We currently determined the antiamebic effectiveness of a blend series where the concentration of metronidazole and gossypol was varied and tested systematically. In the experiments where the gossypol/metronidazole blends were tested, the concentration of each drug was calculated following the Basic Sequential Analytical Simplex Method (10). The analysis was started with blends 1-3, with drug concentrations equivalent to sub-multiples from each drug IC_{50} (metronidazole, 204 nM and gossypol, 20 nM). The above IC_{50} values were calculated as described elsewhere (8). Blend (1) con-

tained $1/2 IC_{50}$ metronidazole plus $1/2 IC_{50}$ gossypol; blend (2), $1/2 IC_{50}$ metronidazole, $1/4 IC_{50}$ gossypol, and blend (3) $1/4 IC_{50}$ metronidazole plus $1/2 IC_{50}$ gossypol. The culture tubes, containing 11 ml medium and 1×10^7 amebas/ml, were mixed with 50 μ l from each drug solution, concentrated 200 times with respect to their final concentration. The tubes were incubated for 72 h at 36°C, cooled on ice water for 10 min and the number of trophozoites/ml in each tube determined with an haemocytometer.

The results were estimated as the percentage of growth inhibition with respect to the untreated controls.

Results and Discussion

The combination that produced the best results corresponded to the blend of 8.5 nM gossypol and 140.36 nM metronidazole, corresponding to a molar relationship of 1:17. Thus, metronidazole (88.61 nM)/gossypol (9.95 nM) blend could be the best alternative to be tested *in vivo*. In our assay conditions, this blend produced one of the highest amebic growth inhibitory effects with drug concentrations 50% lower than those required to produce a similar effect with metronidazole or gossypol alone.

When metronidazole and gossypol were tested separately at the same concentrations used in the best blend, an inhibitory effect of 40.4% and 21.8%, respectively was observed. These results indicate that the inhibitory effect observed with the blend is the result of an antiamebic additive synergism of gossypol and metronidazole.

The results here presented strongly suggest that it is possible to reduce the metronidazole and gossypol doses more than 50% if these are used combined instead of alone. Nevertheless, this possibility needs to be investigated *in vivo*.

Correspondence to:

Dr. Ma. Teresa González Garza y Barrón, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 20, Monterrey, Nuevo León 64720 México. Tel and FAX: (81) 344 4116; e-mail: mtgonzal@academf11.uty.itsem.nix

¹ This project was partially supported by CONACYT (México) grant F328-M9212.

ORIGINAL ARTICLE

Mg, Mn, and Co Ions Enhance the Formation of *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structures Resistant to Sodium Dodecyl Sulfate

Eduardo Campos-Góngora,**** Jose María Viader-Salvadó,*****,*****
Herminia Guadalupe Martínez-Rodríguez,*****, Miguel Angel Zuñiga-Charles,**
Juan Mora Galindo*** and Salvador Said-Fernández*

*División de Biología Celular y Molecular.

****Facultad de Ciencias Biológicas

*****Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

****Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

**División de Farmacología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, Mexico

***División de Biología, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, Mexico

Received for publication May 26, 1999, accepted November 25, 1999 (99A075)

Background. *Entamoeba histolytica* forms cyst-like structures (CLS) in PEHPS but not in TYI-S-33 medium. Sodium dodecyl sulfate [(SDS (0.1%)] dissolves most of them in 10 min, but not natural cysts. Chitin is responsible mainly for cyst wall resistance. Its synthesis depends on Mg^{2+} , Mn^{2+} , or Co^{2+} , whose action is interactive. With the aid of the Simplex method, we analyzed the effect of 20 blends of these cations to find the one that, when added to PEHPS, produced the highest proportion of CLS resistant to 1% SDS (RCLS).

Methods. The concentration of Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} was determined in PEHPS and TYI-S-33 with a flame atomic absorption spectrometer. The proportion of RCLS produced in PEHPS with each ion blend was tested. The CLS and RCLS affinity to fluorescein wheat germ agglutinin (WGA/FITC), which binds chitin, was determined.

Results. PEHPS contained a similar concentration of Co^{2+} (0.52 μM) and 3.4 and 1.6 times more Mg^{2+} (798 μM) and Mn^{2+} (5.15 μM) than TYI-S-33, respectively. The proportion of RCLS increased gradually in PEHPS until reaching $3.6 \pm 1.43\%$ with $MgCl_2$ 1.22 mM, $MnCl_2$ 14.44 mM, and $CoCl_2$ 19.44 mM (ion blend No. 20). Both CLS and RCLS bound WGA/FITC. The RCLS formed in the presence of ion blend No. 20 appeared wrinkled.

Conclusions. Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Co^{2+} enhanced the ability of PEHPS to form RCLS, possibly because these ions stimulated their chitin synthesis. Although ion blend No. 20 produced the highest proportion of RCLS, this high ion concentration may be toxic for encysting amebas. © 2000 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: *Entamoeba histolytica*, Encystation, Cysts, Chitin synthases, Divalent cations, Cyst cell wall, Detergents, Hypotonic shock, Basic Sequential Simplex Method

Introduction

The wall synthesis in *Entamoeba histolytica* cysts is not well understood. This is due mainly to the fact that this spe-

cies rarely forms cysts in currently available culture media.

We previously reported (1) that *E. histolytica*, grown under axenic conditions in PEHPS medium, formed spontaneously cyst-like structures (CLS) at the tenth day of incubation (57% of the entire population). These structures had a cell diameter ($18.3 \pm 4.1 \mu m$) and microscopic appearance similar to those of natural cysts. Some (1.2%) were tetranucleated. All CLS had a bi-refringent wall and resisted lysis by distilled water. CLS bind calcofluor M2R and anti-

Address reprint requests to Salvador Said-Fernández, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Sureste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 020-E, Col. Independencia, 64720, Monterrey, Nuevo León, México. FAX: (528119) 3035. E-mail: salvadorsaid@netscopie.net

Identification of Seven Chemical Factors That Favor High-Quality *Entamoeba histolytica* Cyst-Like Structure Formation Under Axenic Conditions

Francisco González-Salazar,^{***} José M. Viader-Salvadó,^{***} Herminia G. Martínez-Rodríguez,^{****} Eduardo Campos-Góngora,^{*} Benito D. Mata-Cárdenas^{*} and Salvador Said-Fernández^{*}

^{*}División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

^{**}Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Postgrado,

^{***}Departamento de Microbiología

^{****}Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, Mexico

Key Words: *Entamoeba histolytica*, Encystation, Cysts, Simplex method.

Introduction

The biological cycle of *Entamoeba histolytica* consists of two stages: cyst (infective form), and trophozoite (invasive form). While the molecular and cell biology of trophozoites has been intensively studied, encystation is still poorly understood. This fact is mainly due to the absence of a culture medium that permits massive encystation under axenic conditions. We previously pointed out that *E. histolytica* spontaneously forms cyst-like structures (CLS) in PEHPS culture medium. The wall of most CLS did not resist the lytic effect of 0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS) (1). Notwithstanding, when PEHPS was supplemented with an Mg^{2+} (1.22 mM), Mn^{2+} (14.44 mM), and Co^{2+} (19.44 mM) ion blend, the CLS wall resisted 1% SDS for 10 min, although these cells showed an irregular shape and a wrinkled surface (2). In this study, with the aid of the Simplex method (3), we analyzed the effect of 10 factors on high-quality CLS formation (HQ-CLS), under axenic conditions.

Materials and Methods

Amebas and cultivation methods. The *E. histolytica* HM-1:IMSS strain was used in all experiments. Twenty-five media were designed and tested with the aid of the Simplex method modified for multiple variables and multiple responses (3).

The study was performed in four steps. In the first, a matrix of 11 media containing all 10 chemical factors under

study was tested, and the concentration of the factors producing the worst and best results was determined. During the study, the concentration of each factor in the previously mentioned media varied between a lowest and highest limit, chosen arbitrarily. The factors studied and their initial concentration limits were the following: bovine serum (0–1%); glucose (0–6%); sodium tetraborate (0–4 mM); $MgCl_2$ (1–4 mM); $MnCl_2$ (1–10 mM); $CoCl_2$ (1–10 mM); liver and pancreas extract (0–2.5%) (4); Diamond's vitamin mixture 107 (0–0.05%); phosphate (0–0.66 mM), and $CaCl_2$ (0–4 mM). To conform the second set of media, the 10 factors producing the worst results in step 1 were discarded, while the one that produced the best results was kept. By taking into account the concentration of each particular factor in media producing the worst and the best results, a second set of 10 new media were calculated. Results obtained with each media from the second set were compared with results obtained with the best media from the first set (3). By following this procedure, four additional media were discarded and substituted by four new media, which conformed the third set. The corresponding results were compared with the results of the former media, discarding only one medium. The substituting medium conformed the fourth set. The study was finished when the latter media produced worse results than those produced by any of the former.

All media were freshly prepared, using a basal medium (Casein peptone 2% in double-distilled water). This medium was distributed in 6-mL aliquots, in glass 16 × 125-mm screwcap tubes, and appropriate volumes of each of the previously described components were added, reaching a final volume of 12 mL. All tubes were gently stirred, immediately inoculated with 2.1×10^6 trophozoites, and incubated for 7 days at 37°C. All determinations were made in triplicate.

HQ-CLS evaluation. The biological quality of HQ-CLS produced in each of the previously described media was es-

Address reprint requests to: Salvador Said-Fernández, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Av. 1 de Abril y San Luis Potosí, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, México. Telefax: (+52) (81) 190-2035, E-mail: salvadorsaid@nortescap.net

Presenting author: Francisco González-Salazar

ORIGINAL PAPER

Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*

Ute Willhoeft, Eduardo Campos-Góngora, Sassia Touznl, Iris Bruchhaus, and Egbert Tannich¹

Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht Str. 74, 20359 Hamburg, Germany

Submitted March 23, 2001; Accepted May 10, 2001
Monitoring Editor: R. Iain Wilson

The genome of *Entamoeba histolytica* is considered to possess very few intervening sequences (introns), as only 5 intron-containing genes from this protozoan parasite have been reported so far. However, while sequencing a number of genomic contigs as well as three independent genes coding for ribosomal protein L27a, we have identified 9 additional intron-containing genes of *E. histolytica* and the closely related species *Entamoeba dispar*, indicating that introns are more common in these organisms than previously suggested. The various amoeba introns are relatively short comprising between 46 and 115 nucleotides only and have a higher AT-content compared to the corresponding exon sequences. In contrast to higher eukaryotes, amoeba introns do not contain a well-conserved branch point consensus, and have extended donor and acceptor splice sites of the sequences GTTGTT and TAG, respectively. Consistent with the close phylogenetic relationship of *E. histolytica* and *E. dispar*, the position and length of introns is conserved between the two species but the degree of sequence identity is reduced compared to orthologous coding regions.

Introduction

The two intestinal protozoan parasites *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are the closest relatives among all *Entamoeba* species known so far (Clark and Diamond 1997). Both organisms are indistinguishable by morphological criteria and highly similar in genetic background, cell biology and host range (Diamond and Clark 1991). Their close phylogenetic relationship is underlined by the fact that rRNA sequences are as much as 98.4% identical. Despite these similarities the two amoeba species have different properties with regard to pathogenicity. Both colonize the human gut but only *E. histolytica*

is able to cause invasive diseases such as hemorrhagic colitis or extraintestinal abscesses. *E. dispar* is a harmless gut commensal without any pathogenic potential. Thus, the comparison of the two organisms constitutes an interesting area of research towards the identification and analysis of factors that might be instrumental for amoeba pathogenicity.

Recently performed DNA comparisons by Southern blot analysis with a considerable number of *E. histolytica* cDNA probes identified 3 genes that are absent or non-functional in *E. dispar* (Bruchhaus et al. 1996; Willhoeft et al. 1999a; 1999b). In contrast, all other genes as far as investigated are well conserved between the two species and on average, orthologous coding and noncoding sequences

¹ Corresponding author;
fax 49-40-42818-512
e-mail tannich@uni.uni-hamburg.de

not differ significantly ($P > 0.05$) with change in concentration of acetylcholine.

Adaptation to the stimulus was noted in several of the recordings. Three of the 5 nematodes tested showed adaptation within the 2-min period of exposure to 100 mM acetylcholine; adaptation occurred from 54, 89, and 101 sec after the onset of a response. The other 2 recordings showed sustained levels of activity throughout the 2 min. In the response to 10 mM acetylcholine, all 5 nematodes showed adaptation within the 2 min that they were exposed to the stimulus. The mean time taken before adaptation became evident was 21.8 ± 5.3 sec after the onset of a response.

The perfusion system enables sequential exposure of the same nematode to different concentrations of acetylcholine. To verify the contrasting responses to 0.1 and 10 mM acetylcholine, recordings were taken from 5 adult female *L. appendiculara* for a 2-min period prior to, and during, stimulation with 0.1 mM acetylcholine. The acetylcholine was then washed off with fresh PBS, and recording was continued for a further 2 min before each nematode was stimulated with 10 mM acetylcholine. The means and standard errors of the number of spikes per second before, during, and after exposure to 0.1 mM acetylcholine were 0.06 ± 0.02 , 0.10 ± 0.02 , and 0.11 ± 0.02 , respectively; during and after exposure to 10 mM acetylcholine, the values were 0.60 ± 0.08 and 0.11 ± 0.03 , respectively. These data confirmed that there was no increase ($P > 0.05$) in electrical activity on stimulation with 0.1 mM acetylcholine, whereas subsequent exposure to 10 mM acetylcholine elicited a significant ($P \leq 0.05$) response. A typical recording showing the activity obtained from the sequential exposure of an adult female *L. appendiculara* to 0.1 mM acetylcholine and 10 mM acetylcholine is given in Figure 1.

This work on *L. appendiculara* demonstrates the use electrophysiological techniques to record sensory responses from an insect-parasitic nematode. It also demonstrates concentration-dependent responses from a live intact nematode and shows that the use of a perfusion system, allowing a live nematode to be exposed sequentially to different concentrations of a test compound, is a feasible experimental approach to define concentration levels that trigger a response. Colquhoun et al. (1991) mea-

sured the membrane potential of excised somatic muscle cell of *Ascaris suum* in response to acetylcholine and agonists. Acetylcholine depolarized the cells with a threshold around 1 μ M. In the present work, using whole intact nematodes, a threshold concentration below which there was no increase in spike activity was much higher, between 0.1 and 1 mM; it was less than 0.1 mM for *G. rostochiensis* (Rolfe et al., 2000). The actual concentration that is triggering a response in the nematode is likely to be lower than the externally applied concentration and may account for these differences.

Evidence for the role of acetylcholine in *Caenorhabditis elegans* comes from a variety of experimental approaches (Rau and Nonet, 1997), but as yet, no neurotransmitter specific has been assigned to neurons associated with the amphids, the main chemosensilla of nematodes. The increase in spike activity on addition of acetylcholine to *L. appendiculara* could indicate a role in the chemosensory neurons of nematodes (with entry via the cuticle or through the amphidial pore). Alternatively this increase in activity could be due to a chemotactic response indicating an acetylcholine receptor on the amphidial surface or a receptor that shows promiscuous binding.

R.N.R. was supported by a Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) studentship that is gratefully acknowledged. IACR receives grant-aided support from the BBSRC of the United Kingdom.

LITERATURE CITED

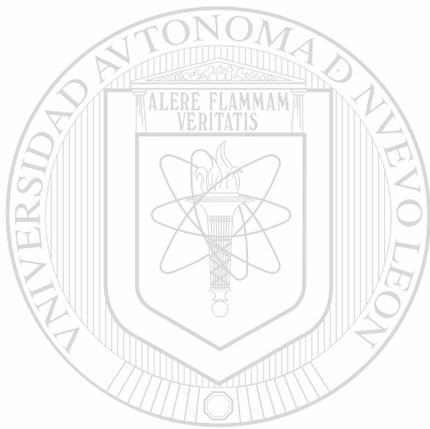
- COLQUHOUN, L. L., HOLDEN-DYE, AND R. WALKER. 1991. The pharmacology of cholinceptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Journal of Experimental Biology* 509-530.
- RAND, J. B., AND M. L. NONET. 1997. Synaptic transmission. In *C. elegans II*, D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, and J. Preiss (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 611-643.
- ROLFE, R. N., J. BARRETT, AND R. N. PERRY. 2000. Analysis of electrosensory responses of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis* using electrophysiological techniques. *Nematology* 525-533.
- ROTH, L. M., AND E. R. WILLIS. 1960. The bionic associations of coelocoches. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 141: 190-211.

Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺ Stimulate *Entamoeba histolytica* to Produce Chitin-like Material

S. Said-Fernandez, E. Campos-Góngora*, F. González-Salazar*, M. G. Martínez-Rodríguez†, J. Vargas-Villarreal†, and J. M. Viac Salvador, División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomedica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 020-E, Colonia Independencia 64720, Monterrey, Nuevo León, México; *Facultad de Ciencias Biológicas, División de Estudios de Postgrado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, 66451 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José E. González, Monterrey, Nuevo León, México; †Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y José E. González, Monterrey, Nuevo León, México; Apartado Postal 1563

ABSTRACT. The mechanism of *Entamoeba histolytica* cyst cell wall synthesis is not well understood. Previous research has shown that cyst-like structures formed in the presence of chitin synthase cofactors (Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺) resist 1% sodium dodecyl sulfate lysis (RCLS),

whereas those formed in the absence of cofactors (CLS) do not, and trophozoites are immediately destroyed. This suggests that *E. histolytica* is able to synthesize chitin, initiating a differentiation process in axenic conditions. To test this hypothesis, polysaccharide hydrolysis



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



